



**Universidad Autónoma De Madrid**

**Programa de Doctorado en Biociencias Moleculares**

**PAPEL DE LA AURORA  
QUINASA B EN LA  
REGULACIÓN EPIGENÉTICA  
INDUCIDA POR EL VIRUS  
DE LA HEPATITIS C**

**Irene Francisco Recuero**

Madrid, 2018

**Departamento de Bioquímica**

**Facultad de Medicina**



**Universidad Autónoma de Madrid**



# **PAPEL DE LA AURORA QUINASA B EN LA REGULACIÓN EPIGENÉTICA INDUCIDA POR EL VIRUS DE LA HEPATITIS C**

Memoria de Tesis Doctoral presentada por:

**Irene Francisco Recuero**

Madrid, 2018

Licenciada en Bioquímica, para optar al grado de Doctora por la Universidad  
Autónoma de Madrid

Dirigida por:

**Dr. Javier García-Samaniego Rey**

**Dra. Aurora Sánchez Pacheco**

Realizada en:

**Fundación para la Investigación Biomédica Hospital Universitario La Paz  
Departamento de Bioquímica. Facultad de Medicina. Universidad Autónoma  
de Madrid**



El **Dr. Javier García-Samaniego Rey** y la **Dra. Aurora Sánchez Pacheco** certifican que **Irene Francisco Recuero**, licenciada en Bioquímica por la Universidad Autónoma de Madrid, ha realizado bajo su dirección conjunta el trabajo de investigación titulado: **“Papel de la Aurora quinasa B en la regulación epigenética inducida por el virus de la hepatitis C”** en la Fundación para la Investigación Biomédica Hospital Universitario la Paz y en la Universidad Autónoma de Madrid, para optar al grado de Doctora por la Universidad Autónoma de Madrid.

Revisado el presente trabajo, expresan su conformidad para la presentación del mismo considerando que reúne los requisitos necesarios para ser sometido a discusión ante el Tribunal correspondiente.

Firmado, para que conste a todos los efectos, en Madrid, a 23 de julio de 2018.

**Fdo. Dr. Javier García-Samaniego Rey**

Director de Tesis

Jefe de Sección de Hepatología. Servicio de  
Digestivo

**Fdo. Dra. Aurora Sánchez Pacheco**

Codirectora de Tesis

Profesora titular

VºBº Tutora

**Dra. Gema Moreno Bueno**

Profesora titular

Este trabajo de tesis ha sido financiado por el Ministerio de Educación, Cultura y Deporte con una ayuda de Formación de Personal Universitario, con referencia FPU13/00945 en la Fundación para la Investigación Biomédica Hospital Universitario La Paz y en el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid.



A Víctor.

## **AGRADECIMIENTOS**

Cuando una importante etapa de tu vida llega a su fin es inevitable acordarse de todas aquellas personas que lo han hecho posible. Empezando por mi familia, que ha soportado las subidas y bajadas de ánimo propias de la tesis doctoral y de la misma vida. Ellos han sido siempre mi mayor apoyo, siempre sosteniéndome, mostrándome paciencia, comprensión, soporte y confianza, dándome las oportunidades que ellos no tuvieron y acompañándome en todas las metas que me propongo, y sé que siempre lo harán así. Gracias, a toda mi familia, los que están y los que se fueron, pues, al fin y al cabo, eres lo que has vivido, y todos me han hecho ser como soy. Gracias también a todas mis amigas y amigos, una tesis no solo es ciencia, hay una vida detrás y vosotros me habéis demostrado que siempre que me caiga vais a estar, siempre, para lo bueno y para lo malo: risas, llantos, consejos, fiestas. Me siento muy afortunada de teneros a mi lado, todos y cada uno de vosotros me aportáis algo, y sé que lo seguiréis haciendo mucho tiempo más.

Como Karl Raimund Popper dijo “La ciencia será siempre una búsqueda, jamás un descubrimiento real. Es un viaje, nunca una llegada”. Y este viaje empezó en el 2012 cuando uno de mis directores, Aurora Sánchez Pacheco, me eligió para hacer el trabajo final de carrera. De ella he aprendido TODO: desde protocolos experimentales, pensamiento crítico, discusión de resultados, el entusiasmo en la docencia y en la investigación; hasta como resolver problemas cotidianos de manera ingeniosa, siempre tiene soluciones para todo. Ella siempre me ha dado su confianza, me ha enseñado a no rendirme y a intentar no renunciar a mis sueños. Gracias Aurora por tu paciencia y por ser mi “madre científica” durante tantos años, me llevo mucho de este viaje a tu lado.

Gracias también a Javier García-Samaniego, mi director de tesis, gracias por darme la oportunidad de hacer la tesis con tu grupo, por confiar en mi trabajo, por preocuparte siempre por mi bienestar, por enseñarme a ser quisquillosa, por sentirte orgulloso de mi y transmitirme ese sentimiento a mí misma. Eres un gran profesional y un gran ejemplo.

No puedo olvidarme tampoco del Dr. Antonio Madejón, prototipo de científico, gracias por aconsejarme tan bien, por enseñarme tanto de tantos ámbitos, por tu paciencia y por tus soluciones, donde veía una puerta cerrada, me enseñaste a ver muchas opciones para encontrar la ventana y, al fin y al cabo, eso es la ciencia.

Gracias a mi tutora, la Dra. Gema Moreno Bueno, por preocuparse por mi bienestar y siempre empujarme a seguir con mis metas.

Gracias también al Dr. Peter Cockerill y a la Dra. Sarah Bevington, del Institute for Cancer and Genomic Sciences (ICGS), College of Medical and Dental Sciences, University of Birmingham. Durante los 3 meses no solo aprendí nuevas técnicas experimentales, sino que desde el principio me acogisteis como una persona más en vuestro grupo y os implicasteis en ayudarme a obtener resultados.

Gracias al grupo del Dr. Esteban Domingo y la Dra. Celia Perales, a ellos y también y muy especialmente a Isabel Gallego, Ana Isabel De Ávila y Julie Sheldon, por colaborar en un proyecto conjunto, por ese *feedback* constructivo a la línea de investigación, y por tantas horas y trabajo dedicados a una meta en común.

Gracias a toda la gente del Instituto de Investigaciones Biomédicas Alberto Sols y también al Hospital Universitario La Paz. Son muchas las personas que con pequeños gestos han facilitado mi estancia en estos centros y me han ayudado, desde Servicios de Cocina y Genómica hasta los vecinos del 0.3 (Merche, Toño, Laura y Paco), que me dieron compañía en los primeros años de soledad. No puedo olvidarme de hacer una mención especial a Miguel Fernández, Lisset Flores y Carlos Gancedo, por toda la ayuda recibida para hacer el CRISPR imposible.

Por supuesto, no podría olvidar al gran grupo de mujeres del 0.4, laboratorio de Amazonas. Desde la Dra. Marina Lasa, que desde el comienzo ha intentado transmitirme su positivismo en momentos de frustración, también su consejo y alegría durante todo este viaje hasta todas y cada una de mis compañeras de laboratorio. Mi camino empezó de la mano de María Gutiérrez, pero a ella la siguieron Irene Díez, Anabel Gil, Emiliana Villafranca, Ana López, Desirée Martínez y Altea Soto; ellas han sido un verdadero pilar en el desarrollo de la tesis. Los cafés, los malos humos, las risas, los bailes, los “fregaos”. Gracias a vosotras venir a trabajar e investigar no solo era fácil, incluso habéis conseguido que venir ir al laboratorio fuera lo mismo que quedar con mis amigas. Me llevo verdaderas amigas, que sé que van a ser para toda la vida.

En definitiva, GRACIAS, porque entre todos habéis hecho este trabajo posible.

---

# **RESUMEN/ABSTRACT**

---

La infección producida por el virus de la hepatitis C (VHC) es una de las principales causas de enfermedad hepática crónica en el mundo y un grave problema de salud pública. El VHC evoluciona a la cronicidad en más del 70% de los casos e induce el desarrollo de fibrosis hepática, que en sus formas más graves puede evolucionar a cirrosis y carcinoma hepatocelular (CHC). Uno de los aspectos menos conocidos es la relación entre la infección por VHC y la inducción de cambios epigenéticos en las histonas, cambios de naturaleza heredable y que afectan a procesos celulares básicos como la regulación de la expresión génica, que pueden conducir al desarrollo de fibrosis y procesos neoplásicos.

Por ello, el objetivo principal de este trabajo ha sido el de analizar la capacidad del VHC de inducir cambios epigenéticos a nivel de modificaciones postraduccionales de histonas, y en el caso de confirmarse, analizar las actividades implicadas en dicho proceso, así como su potencial efecto sobre la evolución de la enfermedad hepática.

Los resultados confirman que el VHC inhibe la fosforilación del residuo de Serina10 de la histona H3 (H3Ser10ph) mediante la actividad de la Aurora quinasa B (AURKB) a través de una interacción directa con la proteína del core viral. El *fitness* viral parece relacionarse con el grado de inhibición de esta marca epigenética. La inhibición de AURKB afecta además a la regulación de la expresión de genes de la ruta inflamatoria *NF-κB* y *COX-2*, que intervienen en el desarrollo de fibrosis y en el control de la apoptosis y la proliferación celular. Los resultados sugieren además que la inhibición de AURKB aumenta la infectividad específica del VHC. Asimismo, se ha observado un incremento en el nivel de aneuploidías asociado a los cambios de actividad de la AURKB, una proteína implicada en la regulación de los procesos de citocinesis y segregación cromosómica, y cuya desregulación afecta a la proliferación celular.

Apoyando el papel de la AURKB en el desarrollo de la fibrosis, hemos llevado a cabo un estudio *in vivo* sobre una cohorte de 348 pacientes con hepatitis C crónica que demuestra cómo la diferente composición alélica en las posiciones rs1059476 y rs2241909 se asocia significativamente con la gravedad de la fibrosis hepática.

Experimentos dirigidos a eliminar el VHC-RNA y las proteínas virales en cultivos celulares mediante el tratamiento combinado con daclatasvir (DCV) y sofosbuvir (SOF) muestran una recuperación de los niveles de H3Ser10ph y AURKB.

Nuestros datos en su conjunto sugieren que la inhibición de AURKB podría ser un nuevo mecanismo utilizado por el VHC para asegurar la persistencia de la infección viral y señalan a la AURKB como un posible marcador de evolución de fibrosis y/o cirrosis hepática.

Hepatitis C virus (HCV) infection is one of the main causes of chronic liver disease worldwide and a very serious public health problem. HCV infection evolves toward chronic disease in more than 70% of the cases leading to hepatic fibrosis development. The most severe forms of hepatic fibrosis can lead to cirrhosis and hepatocellular carcinoma (HCC) development. Nonetheless, the role of HCV infection and epigenetic histone modifications has not been extensively investigated. These epigenetic alterations are inheritable changes that have crucial functions in important cellular processes such as genetic expression regulation, so they could lead to fibrosis development and neoplastic processes.

Thereby, the main aim of this work has been to analyze HCV ability to induce epigenetic changes related to histone post-translational modifications and the enzymatic activities involved, as well as their potential effect in hepatic disease evolution.

Here we show that HCV inhibits the histone H3 phosphorylation in Serine 10 residue (H3Ser10ph) by regulation of Aurora B kinase (AURKB) activity through a direct interaction with HCV core protein. Viral fitness seems to be related to the grade of inhibition of this epigenetic mark. In addition, AURKB inhibition has an effect in the transcription of genes related with inflammatory pathways such as *NF- $\kappa$ B* and *COX-2*. These genes are involved in fibrosis development, apoptosis and cellular proliferation regulation. Moreover, our results suggest that AURKB inhibition increases specific HCV infectivity. Because AURKB is required during mitosis for proper chromosome segregation and cytokinesis, its deregulation has an effect in cellular proliferation. In fact, an increase in aneuploidy has been reported associated to alterations in AURKB activity.

Supporting the role of AURKB in fibrosis development, we have done an *in vivo* study in a cohort of 348 patients with chronic hepatitis C that shown differences in the allelic composition of rs1059476 and rs2241909 significantly associated to the severity of hepatic fibrosis.

Studies conducted to eliminate HVC-RNA and viral proteins in cellular cultures through the combined treatment of daclatasvir (DCV) and sofosbuvir (SOF) shown a reversion in H3Ser10ph and AURKB levels.

Taken together, our results suggest that AURKB inhibition could be a novel mechanism used by HCV to ensure viral infection pointing at AURKB as a putative marker of hepatic fibrosis and/or cirrhosis evolution.

---

# ÍNDICE

---

|  |           |
|--|-----------|
| <b>CLAVE DE ABREVIATURAS .....</b>   | <b>9</b>  |
| <b>INTRODUCCIÓN .....</b>  | <b>17</b> |
| <b>1. Virus de la hepatitis C. Características generales .....</b>                 | <b>19</b> |
| 1.1. Organización del genoma viral .....   | 19        |
| 1.2. Ciclo viral .....   | 20        |
| 1.3. Genotipos y subtipos virales .....  | 21        |
| 1.4. Dimensión clínica de la hepatitis C crónica .....                             | 22        |
| <b>2. Fibrosis hepática .....</b>  | <b>23</b> |
| 2.1. Mecanismos moleculares de la fibrosis hepática .....                          | 24        |
| 2.1.1. Ruta de señalización NF- $\kappa$ B .....                                   | 26        |
| 2.1.2. Polimorfismos asociados a hepatitis C crónica .....                         | 27        |
| <b>3. Carcinoma hepatocelular .....</b>  | <b>28</b> |
| <b>4. Epigenética en el desarrollo de fibrosis y carcinoma hepatocelular .....</b> | <b>30</b> |
| 4.1. Modificaciones covalentes de histonas .....                                   | 30        |
| 4.1.1. Modificaciones covalentes de histonas en fibrosis y CHC .....               | 31        |
| 4.1.2. Modificaciones covalentes de histonas en hepatitis C<br>crónica .....       | 32        |
| <b>5. Aurora quinasa B .....</b>   | <b>33</b> |
| 5.1. Polimorfismos en los genes de la Aurora quinasa .....                         | 36        |
| <b>6. Tratamientos de la hepatitis C y reversión de la fibrosis .....</b>          | <b>37</b> |
| <b>OBJETIVOS .....</b>   | <b>39</b> |
| <b>MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>  | <b>43</b> |
| <b>1. Reactivos .....</b>  | <b>45</b> |
| 1.1. Anticuerpos .....   | 45        |
| 1.2. Plásmidos .....   | 46        |
| 1.3. Oligonucleótidos .....  | 47        |
| 1.4. Líneas celulares .....  | 48        |
| 1.4.1. Células HuH7.5 .....  | 48        |
| 1.4.2. Hepatocitos primarios .....   | 49        |
| 1.5. Cepa infecciosa de VHC .....  | 49        |
| <b>2. Estudio <i>in vitro</i> .....</b>  | <b>49</b> |
| 2.1. Cultivos celulares .....  | 49        |
| 2.1.1. Infección viral .....   | 49        |



|   |           |
|---|-----------|
| 2.1.2. Transfecciones .....   | 50        |
| 2.1.3. Ensayos de RNA de interferencia .....  | 50        |
| 2.1.4. Tratamientos farmacológicos .....  | 50        |
| 2.2. Determinación de los parámetros virales .....  | 51        |
| 2.2.1. Titulación viral .....   | 51        |
| 2.2.2. Determinación del RNA viral .....  | 51        |
| 2.3. Determinación de proteínas .....   | 52        |
| 2.3.1. Extracción de proteínas totales .....  | 52        |
| 2.3.2. Ensayo de Western blot .....   | 52        |
| 2.3.3. Coinmunoprecipitación .....  | 52        |
| 2.3.4. Purificación de proteínas GST .....  | 53        |
| 2.3.5. Ensayo de interacción proteína-proteína <i>in vitro</i> o <i>Pull</i><br><i>down</i> ..... | 53        |
| 2.3.6. Ensayo quinasa .....   | 53        |
| 2.4. Determinación de RNA .....   | 54        |
| 2.4.1. Extracción de RNA .....  | 54        |
| 2.4.2. RT-PCR .....   | 54        |
| 2.4.3. qRT-PCR .....  | 54        |
| 2.4.4. RNA-seq .....  | 54        |
| 2.5. Medida de la actividad transcripcional. Ensayo de luciferasa .....                           | 55        |
| 2.6. Ensayo de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) .....                                      | 55        |
| 2.7. Ensayo de proliferación .....  | 56        |
| 2.8. Ensayo de viabilidad celular .....   | 56        |
| 2.9. Inmunofluorescencia .....  | 57        |
| 2.10. Análisis <i>in silico</i> de los SNPs .....   | 57        |
| 2.11. Análisis estadístico .....  | 57        |
| <b>3. Estudio <i>in vivo</i> .....</b>  | <b>57</b> |
| 3.1. Diseño y ámbito del estudio .....  | 58        |
| 3.2. Criterios de selección de pacientes .....  | 58        |
| 3.3. Periodo de recogida de datos .....   | 58        |
| 3.4. Variables de estudio .....   | 58        |
| 3.4.1. Características demográficas .....   | 58        |
| 3.4.2. Variables epidemiológicas .....  | 59        |
| 3.4.3. Datos virológicos .....  | 59        |
| 3.4.4. Variables clínicas .....   | 59        |

|                         |   |           |
|-------------------------|---|-----------|
| 3.5.                    | Análisis experimental de polimorfismos genéticos .....  | 60        |
| 3.5.1.                  | Extracción de DNA a partir de sangre total .....  | 60        |
| 3.5.2.                  | Análisis de polimorfismos de la secuencia<br>codificante de la AURKB .....  | 61        |
| 3.6.                    | Análisis estadístico .....  | 62        |
| 3.6.1.                  | Análisis descriptivo .....  | 62        |
| 3.6.2.                  | Análisis inferencial .....  | 62        |
| 3.7.                    | Consideraciones éticas y legales .....  | 62        |
| <b>RESULTADOS .....</b> |   | <b>65</b> |
| <b>1.</b>               | <b>Análisis de la regulación epigenética mediada por el VHC .....</b>   | <b>67</b> |
| 1.1.                    | Análisis del efecto del VHC en las modificaciones postraduccionales<br>de las histonas .....  | 67        |
| 1.2.                    | Papel de la AURKB en la disminución de los niveles de H3Ser10ph<br>mediada por el VHC y la proteína viral core .....                          | 69        |
| 1.3.                    | Interacción entre la AURKB y la proteína viral core .....   | 71        |
| 1.4.                    | Alteración de la proliferación y viabilidad celular mediado por la<br>infección por el VHC y la expresión de core .....                       | 73        |
| 1.5.                    | La infección por VHC y la expresión de la proteína core disminuyen la<br>transcripción del promotor de <i>NF-κB</i> .....                     | 76        |
| 1.6.                    | La infección por VHC y la expresión de la proteína core disminuyen la<br>transcripción del promotor y la expresión del gen <i>COX-2</i> ..... | 79        |
| 1.7.                    | Regulación de la expresión de <i>COX-2</i> a nivel de promotor .....  | 81        |
| 1.8.                    | Efecto de la AURKB en la generación de progenie infecciosa .....  | 82        |
| <b>2.</b>               | <b>Análisis del efecto del tratamiento con DAAs en la reversión de los cambios<br/>epigenéticos inducidos por el VHC.....</b>                 | <b>83</b> |
| 2.1.                    | Análisis de la dinámica del establecimiento de marcas epigenéticas<br>tras la infección por el VHC .....                                      | 83        |
| 2.2.                    | Análisis de la dinámica de las marcas epigenéticas tras el tratamiento<br>con DAAs .....  | 85        |
| 2.3.                    | Análisis del efecto de la infección por el VHC y del tratamiento con<br>DAAs sobre la expresión y actividad de la AURKB .....                 | 88        |
| 2.4.                    | Efecto del <i>fitness</i> viral en las marcas epigenéticas .....  | 90        |

|           |  |            |
|-----------|--|------------|
| 2.5.      | Análisis del efecto de la infección por el VHC y del tratamiento con DAAs en la expresión de otras proteínas implicadas en procesos epigenéticos ..... | 92         |
| 2.6.      | Análisis del RNA viral intracelular residual .....   | 93         |
| <b>3.</b> | <b>Análisis de la correlación de los polimorfismos con la progresión de la enfermedad hepática en pacientes con hepatitis C crónica .....</b>          | <b>95</b>  |
| 3.1.      | Análisis del gen <i>AURKB</i> .....  | 95         |
| 3.1.1.    | Selección de SNPs para análisis .....  | 97         |
| 3.2.      | Análisis bioinformático de los SNPs de <i>AURKB</i> .....  | 99         |
| 3.3.      | Amplificación de la región codificante de <i>AURKB</i> y análisis de polimorfismos .....   | 100        |
| 3.4.      | Análisis estadístico de la distribución de los pacientes.....  | 100        |
| 3.5.      | Análisis estadístico de la distribución de los SNPs seleccionados .....  | 101        |
| 3.5.1.    | Análisis global de la distribución de las frecuencias alélicas de rs1059476.....   | 101        |
| 3.5.2.    | Análisis global de la distribución de las frecuencias alélicas de rs2241909.....   | 103        |
| 3.5.3.    | Análisis estratificado por genotipo viral .....  | 105        |
| 3.5.4.    | Análisis estratificado por grupos de edad .....  | 107        |
| <b>4.</b> | <b>Análisis molecular de los SNPs de <i>AURKB</i> .....</b>  | <b>111</b> |
| 4.1.      | Caracterización de la línea celular HuH7.5 .....   | 112        |
| 4.2.      | Clonaje de las secuencias codificantes de <i>AURKB</i> en plásmidos .....  | 113        |
| 4.3.      | Determinación de la actividad quinasa de las variantes polimórficas de la AUKB .....   | 113        |
| 4.4.      | Determinación de la capacidad de interacción de las variantes polimórficas de la AURKB con la proteína viral core .....                                | 114        |
| 4.5.      | Determinación del efecto de los polimorfismos de AURKB en genes de la ruta inflamatoria .....  | 115        |
| 4.6.      | Análisis de la sobreexpresión de las variantes AURKB C/C y AURKB C/T (rs1059476) durante la mitosis en células HuH7.5 .....                            | 116        |
| 4.7.      | Determinación de la capacidad de interacción de las variantes polimórficas de la AURKB con la proteína CHMP4C .....                                    | 116        |
| 4.8.      | Análisis de la sobreexpresión de las variantes AURKB C/C y AURKB C/T (rs1059476) en la proliferación celular .....                                     | 117        |

|                                     |            |
|-------------------------------------|------------|
| <b>DISCUSIÓN .....</b>              | <b>119</b> |
| <b>CONCLUSIONES .....</b>           | <b>135</b> |
| <b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>           | <b>139</b> |
| <b>ANEXO 1: PUBLICACIONES .....</b> | <b>149</b> |

---

# **CLAVE DE ABREVIATURAS**

---

|                                |   |
|--------------------------------|---|
| <b><math>\alpha</math>-SMA</b> | $\alpha$ -actina del músculo liso                             |
| <b>AKT/PKB</b>                 | Proteína quinasa B  |
| <b>ANCHR</b>                   | Regulador del <i>checkpoint</i> de abscisión/ <i>NoCut</i> .  |
| <b>APC/C<sup>Cdh1</sup></b>    | Complejo promotor de anafase o ciclosoma con el cofactor Cdh1 |
| <b>ApoE</b>                    | Apolipoproteína E   |
| <b>ARF</b>                     | Factor de ribosilación de ADP                                 |
| <b>ASH2</b>                    | Histona metiltransferasa de lisinas                           |
| <b>AURKA</b>                   | Aurora quinasa A  |
| <b>AURKB</b>                   | Aurora quinasa B  |
| <b>AURKC</b>                   | Aurora quinasa C  |
| <b>Bcl-XL</b>                  | Linfoma de células B-extra larga                              |
| <b>BIRC5</b>                   | <i>Baculoviral IAP Repeat Containing 5</i>                    |
| <b>BSA</b>                     | Albúmina Sérica Bovina  |
| <b>c-FLIP</b>                  | Proteína inhibidora de FLICE celular                          |
| <b>CCL2</b>                    | Ligando de quimioquina 2                                      |
| <b>CCL8</b>                    | Ligando de quimioquina 8                                      |
| <b>CCNA2</b>                   | Ciclina A2  |
| <b>CD81</b>                    | Clúster de diferenciación 81                                  |
| <b>CDCA3</b>                   | Proteína asociada al ciclo de división celular 3              |
| <b>CDK1</b>                    | Quinasa dependiente de ciclinas 1                             |
| <b>CDKN2A</b>                  | Inhibidor de la quinasa dependiente de ciclina 2A             |
| <b>CHC</b>                     | Carcinoma hepatocelular                                       |
| <b>CHGA</b>                    | Cromogranina A  |
| <b>CHK1</b>                    | Quinasa del <i>checkpoint</i> - 1                             |
| <b>CHK2</b>                    | Quinasa del <i>checkpoint</i> - 2                             |
| <b>CHMP4C</b>                  | Proteína del cuerpo multivesicular cargado 4C                 |
| <b>CHRNA3</b>                  | Receptor colinérgico nicotínico alpha 3                       |
| <b>CLK1, 2, 4</b>              | Quinasa tipo Cdc-2  |
| <b>CMSPs</b>                   | Células mononucleares de sangre periférica                    |
| <b>CoIP</b>                    | Coinmunoprecipitación   |
| <b>COL1A1</b>                  | Colágeno 1  |
| <b>COX-2</b>                   | Ciclooxigenasa 2  |
| <b>CPC</b>                     | Complejo pasajero del cromosoma                               |
| <b>CRABP1</b>                  | Proteína celular ligada al ácido retinoico 1                  |

|                  |  |
|------------------|--|
| <b>CYK-4</b>     | Proteína GTPasa activadora de RhoA                                       |
| <b>DAAs</b>      | Antivirales de acción directa  |
| <b>DCV</b>       | Daclatasvir  |
| <b>DMEM</b>      | Medio de cultivo Eagle modificado por Dulbecco                           |
| <b>DNMT</b>      | DNA metiltransferasa   |
| <b>DOK1</b>      | <i>Docking protein 1</i>   |
| <b>ELK-1</b>     | Proteína con dominio ETS-1   |
| <b>EMT</b>       | Transición epitelio-mesénquima   |
| <b>ERK</b>       | Quinasa regulada extracelularmente                                       |
| <b>ESCRT-III</b> | Complejos de clasificación endosómicos requeridos para el transporte III |
| <b>EZH2</b>      | <i>Enhancer</i> de zeste homólogo 2                                      |
| <b>FOXA1</b>     | Factor de transcripción <i>Forkhead box A1</i>                           |
| <b>FOXA2</b>     | Factor de transcripción <i>Forkhead box A2</i>                           |
| <b>FRET</b>      | Transferencia de energía por resonancia de fluorescencia                 |
| <b>G9a</b>       | Histona H3K9 metiltransferasa  |
| <b>GAAD45a</b>   | Proteína de arresto de crecimiento y daño al DNA 45a                     |
| <b>GADD45b</b>   | Proteína de arresto de crecimiento y daño al DNA 45b                     |
| <b>GST</b>       | Glutation S-transferasa  |
| <b>GSTP1</b>     | Gen Glutation S-transferasa P  |
| <b>H3Ac</b>      | Histona H3 acetilada   |
| <b>H3K9me2</b>   | Dimetilación del residuo de lisina 4 de la histona H3                    |
| <b>H3K9me2</b>   | Dimetilación del residuo de lisina 9 de la histona H3                    |
| <b>H3K9me3</b>   | Trimetilación del residuo de lisina 9 de la histona H3                   |
| <b>H3Ser10ph</b> | Fosforilación del residuo de serina 10 de la histona H3                  |
| <b>HAT</b>       | Acetiltransferasa de histonas  |
| <b>HDAC</b>      | Deacetilasa de histonas  |
| <b>HIC1</b>      | Proteína hipermetilada en cáncer 1                                       |
| <b>HMT</b>       | Metiltransferasa de histonas   |
| <b>HNF4A</b>     | Factor nuclear 4 alfa de hepatocito                                      |
| <b>HP1</b>       | Proteína de la heterocromatina 1   |
| <b>HSC</b>       | Células estrelladas del hígado   |
| <b>HSCa-MF</b>   | Miofibroblastos proliferativos activados                                 |
| <b>HSCq</b>      | HSC quiescentes  |
| <b>IFN</b>       | Interferón   |

|                   |  |
|-------------------|--|
| <b>IFNL3</b>      | Interferón lambda-3  |
| <b>IFNL4</b>      | Interferón lambda-4  |
| <b>IκB</b>        | Inhibidor de NF-κB   |
| <b>IKK</b>        | Quinasa de IκB   |
| <b>IL-10</b>      | Interleuquina 10   |
| <b>IL-1β</b>      | Interleuquina 1β   |
| <b>IL-20</b>      | Interleuquina 20   |
| <b>IL-22</b>      | Interleuquina 22   |
| <b>IL-6</b>       | Interleuquina 6  |
| <b>INCENP</b>     | Proteína del centrómero interno  |
| <b>IPS-1</b>      | Proteína estimuladora del promotor de interferón beta 1                          |
| <b>KDM</b>        | Demetilasa de histonas   |
| <b>KIF18A</b>     | Quinesina 18A  |
| <b>LDLR</b>       | Receptor de lipoproteínas de baja densidad                                       |
| <b>LINE1</b>      | Elemento largo intercalado 1   |
| <b>LNA</b>        | Ácidos nucleicos bloqueados  |
| <b>LSD1</b>       | Demetilasa-1 específica de lisinas   |
| <b>LTβR</b>       | Receptor de la linfotoxina β   |
| <b>MAD2</b>       | Proteína de deficiencia de arresto mitótico 2                                    |
| <b>MAPK</b>       | Proteína quinasa activada por mitógenos  |
| <b>MCAK</b>       | Quinesina asociada al centrómero mitótico  |
| <b>MEC</b>        | Matriz extracelular  |
| <b>MERTK</b>      | Protooncogén tirosina-quinasa c-mer  |
| <b>MIF</b>        | Frecuencia del alelo minoritario   |
| <b>MKI67</b>      | Marcador de proliferación Ki-67  |
| <b>MMP</b>        | Metaloproteinasas de matriz  |
| <b>mRNA</b>       | RNA mensajero  |
| <b>MSK1</b>       | Proteína quinasa activada por mitógenos o estrés 1                               |
| <b>MTT</b>        | 3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium Bromide, Thiazole Blue) |
| <b>NDC80/HEC1</b> | Proteína altamente expresada en cáncer 1   |
| <b>NF-κB</b>      | Factor nuclear potenciador de cadenas ligeras kappa de células B                 |
| <b>NS</b>         | Proteínas no estructurales   |
| <b>NUF2</b>       | Complejo de proteínas asociado al centrómero                                     |



|                                    |   |
|------------------------------------|---|
| <b>NUSAP1</b>                      | Proteína asociada al nucleolo y al huso 1                   |
| <b>OMS</b>                         | Organización Mundial de la Salud                            |
| <b>ORF</b>                         | Marco de lectura abierta                                    |
| <b><i>p-valor</i></b>              | Coeficiente de correlación de Pearson                       |
| <b>p16/INK4</b>                    | Inhibidor de la quinasa dependiente de ciclina 4            |
| <b>PARP</b>                        | Poli ADP ribosa polimerasa                                  |
| <b>pAURKB</b>                      | Aurora quinasa B fosforilada en el residuo de treonina 232  |
| <b>PDGF</b>                        | Factor de crecimiento derivado de plaquetas                 |
| <b>PEG-IFN-<math>\alpha</math></b> | Interferón pegilado   |
| <b>PI3K</b>                        | Fosfatidilinositol- 3-quinasa                               |
| <b>PKR</b>                         | Proteína quinasa R  |
| <b>PLK</b>                         | <i>Polo-like kinase</i>                                     |
| <b>PP1</b>                         | Proteína fosfatasa 1  |
| <b>PP2A</b>                        | Proteína fosfatasa 2A                                       |
| <b>PPAR<math>\gamma</math></b>     | Receptor activador de la proliferación del peroxisoma gamma |
| <b>PRC2</b>                        | Complejo represor del Polcomb 2                             |
| <b>PRDM2</b>                       | Proteína 2 con dominio PR y dedos de zinc                   |
| <b>PRMT1</b>                       | Proteína metiltransferasa de arginina 1                     |
| <b>PTEN</b>                        | Gen supresor de tumores homólogo de fosfatasa y tensina     |
| <b>q-PCR</b>                       | PCR cuantitativa  |
| <b>RACGAP1</b>                     | Proteína GTPasa activadora de Rac 1                         |
| <b>RASAL1</b>                      | Activador de la proteína RAS tipo 1                         |
| <b>RASSF1A</b>                     | Proteína con dominio de asociación a Ras 1A                 |
| <b>RB</b>                          | Retinoblastoma  |
| <b>RBV</b>                         | Ribavirin   |
| <b>RhoA</b>                        | GTPasa de la familia de Ras A                               |
| <b>RMN</b>                         | Resonancia Magnética Nuclear                                |
| <b>RNF7</b>                        | Proteína <i>RING-box 2</i>                                  |
| <b>ROS</b>                         | Especies reactivas de oxígeno                               |
| <b>RSK2</b>                        | Quinasa ribosomal S6-2                                      |
| <b>RUNX3</b>                       | Factor de transcripción relacionado con Runt 3              |
| <b>RVS</b>                         | Respuesta viral sostenida                                   |
| <b>SAT2</b>                        | Acetiltransferasa de diamina 2                              |
| <b>SFPR1</b>                       | Proteína 1 secretada relacionada con Frizzled               |

|                          |  |
|--------------------------|--|
| <b>siRNA</b>             | RNA pequeños interferentes   |
| <b>SNP</b>               | Polimorfismos de un solo nucleótido  |
| <b>SOC-1</b>             | Supresor de Ckr 1  |
| <b>SOCS1</b>             | Supresor de señalización de citoquinas 1   |
| <b>SOF</b>               | Sofosbuvir   |
| <b>SR-BI</b>             | Receptor Scavenger clase B, tipo I   |
| <b>STAT1</b>             | Transductor de la señal y activador de la transcripción 1                                |
| <b>STAT4</b>             | Transductor de la señal y activador de la transcripción 4                                |
| <b>SUK</b>               | Quinasa de azúcares  |
| <b>Suv39H2</b>           | Supresor homólogo 2 de la variegación 3-9  |
| <b>TAC</b>               | Tomografía Axial Computarizada   |
| <b>TCID<sub>50</sub></b> | Dosis infecciosa necesaria para infectar el 50% de las células en un cultivo celular     |
| <b>TFG-β1</b>            | Factor de crecimiento transformador β1   |
| <b>TIMPs</b>             | Inhibidores de tejido de metaloproteinasas   |
| <b>TLL1</b>              | <i>Tolloid-like protein 1</i>  |
| <b>TNF-α</b>             | Factor de necrosis tumoral α   |
| <b>TNFR</b>              | Receptor de TNF  |
| <b>TSA</b>               | Tricostatina A   |
| <b>TULP1</b>             | Proteína relacionada con Tubby 1   |
| <b>UTR</b>               | Región no traducida  |
| <b>VEGF</b>              | Factor de crecimiento endotelial vascular  |
| <b>VHB</b>               | Virus de la hepatitis B  |
| <b>VHC</b>               | Virus de la hepatitis C  |
| <b>VHC-p0</b>            | Un preparado clonal de VHC que no ha sido sometido a pases seriados                      |
| <b>VHC-p100</b>          | Virus VHC-p0 que ha sido sometido a 100 pases seriados en células HuH7.5 <i>reporter</i> |
| <b>VHC-p200</b>          | Virus VHC-p0 que ha sido sometido a 200 pases seriados en células HuH7.5 <i>reporter</i> |
| <b>VIH</b>               | Virus de la Inmunodeficiencia Humano   |
| <b>VPS4</b>              | Proteína de clasificación vacuolar 4   |
| <b>WNT</b>               | Proteínas <i>Wingless e Int</i>  |
| <b>XIAP</b>              | Proteína inhibidora de apoptosis ligada al X   |
| <b>YY1</b>               | Ying Yang 1  |

---

# INTRODUCCIÓN

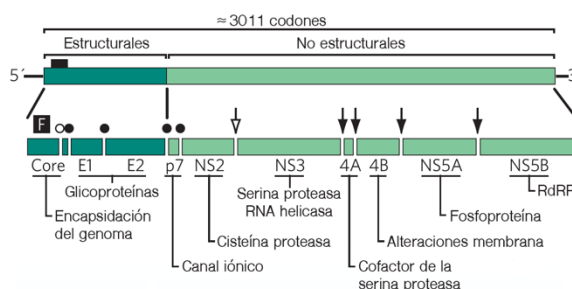
---

## 1. VIRUS DE LA HEPATITIS C. CARACTERÍSTICAS GENERALES

La infección provocada por el VHC es actualmente una de las principales causas de enfermedad hepática crónica en todo el mundo y un grave problema de salud pública. La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que actualmente existen 71 millones de personas infectadas por VHC en todo el mundo (WHO, April 2018-última actualización [1]).

### 1.1. ORGANIZACIÓN DEL GENOMA VIRAL

El VHC es un virus hepatotrofo de transmisión parenteral/sexual que pertenece a la familia *Flaviviridae*, género *Hepacivirus* [2]. El VHC posee un genoma de RNA monocatenario de 9.6 kb de polaridad positiva, que sirve tanto de RNA mensajero para la traducción de proteínas virales, como de molde para la replicación y como molécula de RNA genómico para empaquetar en nuevas partículas virales. El genoma del VHC contiene un único marco de lectura abierta (ORF) flanqueado por regiones no traducidas (UTRs) que son esenciales para la replicación del virus. Codifica para una única poliproteína de aproximadamente 3000 aminoácidos, que va a ser procesada generando 10 proteínas: 3 estructurales y 7 no estructurales. El primer tercio amino-terminal codifica para las proteínas estructurales: core y las glicoproteínas E1 y E2, que forman parte de la partícula viral y de la membrana externa. A continuación, codifica para una proteína integral de membrana, p7, que parece funcionar como un canal iónico. El resto del genoma codifica para las proteínas no estructurales (NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A y NS5B), que se encargan de coordinar los procesos intracelulares del ciclo viral [3] (*Figura 1*).



**Figura 1. Virus de la hepatitis C. Estructura del genoma viral.** El procesamiento de la poliproteína se muestra abajo, siendo los círculos negros sitios de reconocimiento para la escisión por la peptidasa y el círculo blanco el péptido de señalización para la peptidasa, las flechas negras corresponden a los sitios de corte de la proteasa viral NS3/4A y la flecha blanca muestra el sitio de corte de la autoproteasa NS2. Imagen adaptada de Lindenbach, B.D. et al., 2005 [3].

Estructuralmente, la partícula viral está constituida por una nucleocápside formada mayoritariamente por la proteína del core, que presenta dos dominios que se incluyen en la nucleocápside y un dominio transmembrana en la secuencia C- terminal. Envolviendo la cápside se encuentra una estructura membranosa de origen celular en la que se embeben las glicoproteínas E1 y E2 [4].

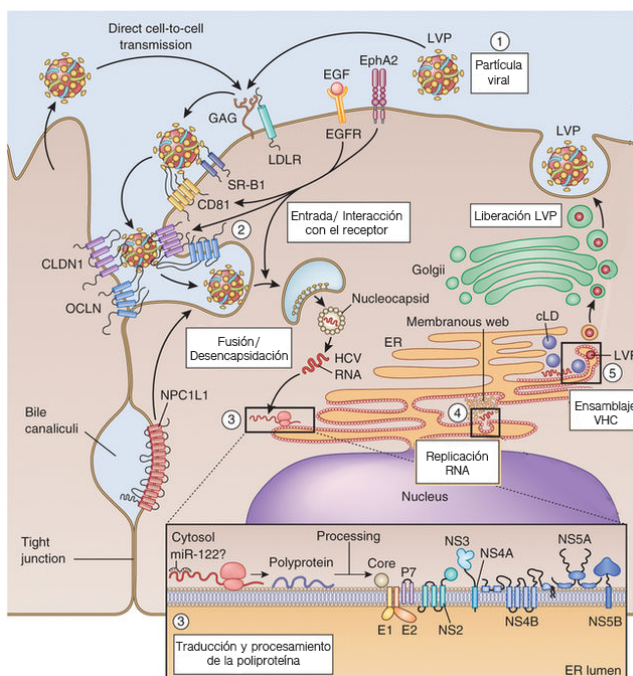
Además del papel estructural y funcional de las proteínas virales sobre el ciclo replicativo viral, se ha descrito una gran variedad de interacciones entre las proteínas virales y actividades

celulares que regulan importantes funciones. Así, se ha demostrado que la proteína core juega un importante papel en la regulación de la expresión de multitud de genes relacionados con procesos como la apoptosis, ciclo celular o la respuesta inmune (*p21*, ciclina B1, *NF-κB*) [5] mediante la interacción con proteínas como 14-3-3ε y con las vías ERK1/2, p38-MAPK [6, 7].

Asimismo, se ha descrito como las proteínas funcionales del VHC, incluyendo las actividades NS5A, NS3 y NS5B, interaccionan con proteínas celulares relacionadas con el desarrollo de CHC; entre ellas desracan CDK1 (Quinasa dependiente de ciclinas 1), NDC80 (Proteína altamente expresada en cáncer 1), CCNA2 (Ciclina A2) y RACGAP1 (Proteína GTPasa activadora de Rac 1), cuya expresión está desregulada [8].

## 1.2. CICLO VIRAL

Durante el proceso de infección, como se observa en la figura 2, las partículas virales interactúan con receptores específicos de la membrana celular tales como el receptor de partículas LDL (LDLR), y los co-receptores SR-BI y CD81 entre otros, promoviendo su internalización a través de endocitosis mediada por clatrina. Una vez el contenido de la partícula viral es liberado al citoplasma en un proceso mediado por un descenso de pH en la vesícula, tienen lugar los procesos de traducción y replicación viral.



**Figura 2. Ciclo viral del virus de la hepatitis C.** Ciclo general de entrada/replicación del VHC. En el recuadro se representa la disposición de las diferentes proteínas virales en el complejo replicativo. Imagen adaptada de Scheel, T.K. et al., 2013 [10].

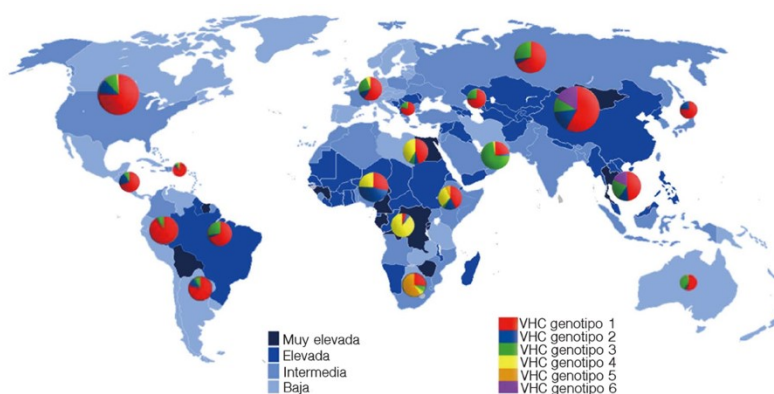
La traducción endoplasmática del genoma viral depende de una secuencia IRES en la región 5' no codificante. En el retículo endoplasmático esta secuencia se une a la subunidad ribosómica 40S directamente, reclutando factores de iniciación eucarióticos. La poliproteína es proteolizada postraduccionalmente mediante la acción conjunta de proteasas celulares (signalasa y signal peptide peptidasa) y virales (proteasas NS2-NS3 y NS3-NS4A) liberando las 10 proteínas virales estructurales y no estructurales [9, 10].

El RNA viral es empleado además para la producción de cadenas de RNA de polaridad negativa que se usarán como molde para la generación de nuevas moléculas de genoma, con polaridad positiva. Posteriormente, los nuevos genomas serán encapsulados en partículas virales y liberados al medio extracelular para la propagación de la infección [10]. La replicación del VHC es un proceso estrictamente citoplasmático, sin fases de DNA conocidas hasta el momento que pudieran generar reservorios intracelulares.

### **1.3. GENOTIPOS Y SUBTIPOS VIRALES**

El VHC se replica a través de la proteína viral NS5B, una RNA polimerasa-RNA dirigida que carece de la actividad correctora, por lo que tiene una alta tasa de error, dando lugar a una elevada heterogeneidad genética [11]. Así, el VHC no aparece en los pacientes infectados como una única población viral, sino como una colección dinámica y compleja de mutantes denominados cuasiespecies virales [12]. La alta tasa de variabilidad tiene gran importancia en la historia natural de la infección por VHC, ya que le proporciona una enorme versatilidad a la hora de adaptarse a diferentes situaciones ambientales, incluyendo la presión farmacológica [11].

Dentro de esta variabilidad ha sido posible identificar 7 genotipos principales, que difieren en su secuencia de nucleótidos en un 25-35%. Los genotipos virales son subclasificados a su vez en un total de 67 subtipos, con una divergencia superior al 15% [11, 13]. Existen diferencias en la distribución de los distintos genotipos virales a nivel mundial (*Figura 3*). El genotipo 1 es el más prevalente, dominando en América, Japón y Europa; el genotipo 2 predomina en África occidental y el norte de Italia; el genotipo 3 está ampliamente distribuido por el sureste asiático; los genotipos 4 y 5 son más comunes en África central y Suráfrica respectivamente; mientras que el genotipo 6 se encuentra distribuido por Asia. El genotipo 7 se ha encontrado tan solo en unos pocos individuos en África central [11, 13].



**Figura 3. Prevalencia y distribución mundial de los diferentes genotipos del VHC.** Imagen adaptada de Daw, M.A., et al., 2016 [13].

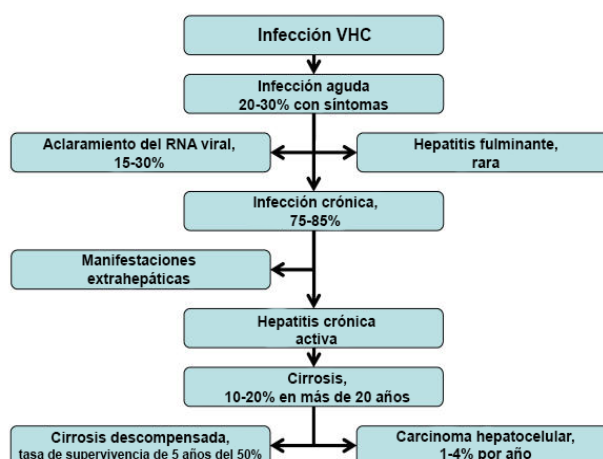
La situación epidemiológica de la infección por hepatitis C ha variado drásticamente durante los últimos años en función de cuatro factores fundamentales: a) el incremento de la

seguridad en las transfusiones sanguíneas, b) la mejora de las condiciones sanitarias, c) la exposición a drogas por vía parenteral y d) la inmigración de habitantes de zonas endémicas. Todos estos factores están contribuyendo a que haya un cambio en la distribución de los genotipos, con un incremento en la aparición del genotipo 3 ligado al abuso de drogas por vía parenteral y del 4 debido a la población inmigrante [13, 14].

Aunque la evolución de la enfermedad hepática en los pacientes infectados con los diferentes genotipos es esencialmente igual, si se han observado diferencias clínicas entre ellos. El genotipo 3 está asociado a un mayor riesgo de esteatosis hepática y progresión de la enfermedad a carcinoma hepatocelular y los genotipos 1 y 4 parecen estar asociados a un mayor riesgo de aparición de resistencia a la insulina. También existen algunas diferencias asociadas a determinados genotipos y subtipos en cuanto a la respuesta al tratamiento antiviral [10, 11].

## 1.4. DIMENSIÓN CLÍNICA DE LA HEPATITIS C CRÓNICA

La infección crónica por VHC es conocida como la “pandemia silenciosa” debido a que tiene una elevada incidencia y permanece asintomática durante un largo periodo de tiempo en el 70-80% de los casos, hasta que la enfermedad evoluciona a cirrosis, descompensación de la misma y carcinoma hepatocelular (CHC). En un 15-25% de los pacientes se produce un aclaramiento espontáneo del virus y en raras ocasiones se produce una hepatitis fulminante. La infección por hepatitis C presenta una marcada tendencia a la cronicidad, y alrededor del 75-85% de los pacientes que sufren una hepatitis aguda por VHC desarrollarán hepatitis crónica [15, 16]. La tasa de progresión de la fibrosis es altamente variable y está influenciado por el consumo de alcohol, la edad del individuo cuando se produce la infección, el grado de inflamación y fibrosis, la coinfección con VHB (Virus de la hepatitis B) o VIH (Virus de la Inmunodeficiencia Humano) y otras condiciones de comorbilidad. Aproximadamente un 10-20% de los individuos infectados



**Figura 4. Epidemiología de la infección crónica por VHC.** Imagen adaptada de Axley, P. et al., 2018 [15].

crónicamente por el VHC desarrollan cirrosis hepática en un periodo medio de 20-30 años; de los cuales, un 1-4% desarrollarán CHC (Figura 4) [15].

## **2. FIBROSIS HEPÁTICA**

La fibrosis es un proceso de cicatrización que se define como la acumulación excesiva de tejido conectivo fibroso, es decir, de componentes de la matriz extracelular (MEC) como el colágeno y la fibronectina en un tejido inflamado o dañado. En el hígado, la fibrosis ocurre como respuesta al daño hepático reiterado subyacente a las enfermedades crónicas que cursan con un proceso inflamatorio durante un periodo de tiempo prolongado, tales como la infección crónica por los virus de la hepatitis B y C, enfermedad del hígado graso no alcohólico, enfermedad hepática alcohólica, enfermedades metabólicas hereditarias o procesos colestáticos [17-19].

El parénquima hepático está constituido por hepatocitos, células endoteliales que constituyen los vasos sanguíneos hepáticos con sus característicos poros y fenestraciones, células de Kupffer o macrófagos propios del tejido y células estrelladas del hígado (HSC), que son células mesenquimales perivasculares. La MEC del hígado es esencial a la hora de mantener las funciones diferenciales de las distintas células hepáticas [20].

La fibrosis se inicia como consecuencia de una respuesta inflamatoria. Durante una lesión aguda, la muerte celular desencadena la activación de la cascada inflamatoria y de la fibrogénesis, contribuyendo a la eliminación de los restos celulares y promoviendo la regeneración hepática con el fin de restaurar las funciones del hígado tras el daño. Ello implica una alteración en la composición y cantidad de la MEC. Sin embargo, cuando el estímulo que está provocando el daño no puede ser eliminado, la lesión prevalece y tiene lugar un proceso de inflamación crónica y el desarrollo progresivo de fibrosis hepática [21], con una acumulación excesiva de fibras de colágeno (COL1A1) y otros componentes de la matriz en el parénquima hepático provocando una alteración de la arquitectura del tejido hepático que afecta a la función hepatocelular y un aumento de resistencia al flujo sanguíneo [17-19]. En última instancia, la fibrosis hepática deriva en cirrosis, un estadio caracterizado por la formación de septos y nódulos de regeneración en el parénquima hepático que conlleva una pérdida progresiva de las funciones del hígado y el desarrollo de hipertensión portal e insuficiencia hepatocelular. El desarrollo de cirrosis descompensada, y eventualmente de CHC, tiene un efecto negativo en el perfil de supervivencia de estos pacientes, siendo el trasplante hepático la única alternativa terapéutica efectiva [19].

La progresión de la enfermedad hepática varía enormemente entre los pacientes con hepatitis crónica C, pudiendo distinguir entre fibrosadores lentos, intermedios y rápidos. El tiempo medio estimado para desarrollar cirrosis tras la infección por hepatitis C son 20-25



años. Se consideran *progresores* lentos aquellos pacientes que desarrollan cirrosis durante un tiempo de progresión superior a 40-50 años, pacientes que tras 50 años no hayan alcanzado el grado de cirrosis o pacientes que tras 20 años de seguimiento presenten niveles bajos de fibrosis (Fibrosis  $\leq 2$ ); y *progresores* rápidos aquellos que desarrollan cirrosis durante un periodo de infección inferior a 20 años [22].

### **2.1. MECANISMOS MOLECULARES DE LA FIBROSIS HEPÁTICA**

Se han descrito algunos factores del huésped que contribuyen a la progresión de la enfermedad hepática tales como la edad, el consumo de alcohol y el sexo masculino [22]. Por otro lado, los factores genéticos del huésped como los polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) podrían jugar un importante papel en la determinación del riesgo de progresión de la fibrosis hepática [23, 24]. En este sentido, se ha descrito la asociación de numerosos polimorfismos presentes en genes involucrados en la respuesta inflamatoria, como *TFG- $\beta$ 1* (factor de crecimiento transformador  $\beta$ 1), Angiotensinógeno, *ApoE* (apoproteína E) y *EC 3.3.2.9* (epóxido hidrolasa microsomal), con la progresión del proceso fibrótico en hepatitis C crónica [25].

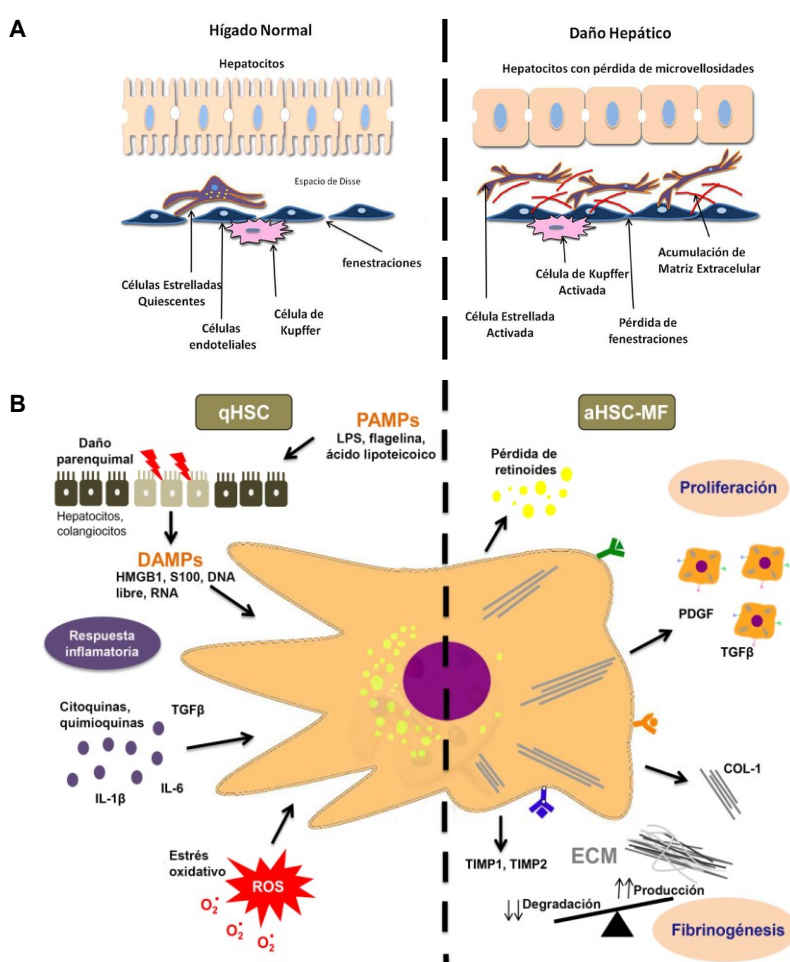
La fibrogénesis hepática se caracteriza por: 1) la persistencia de un daño hepatocelular/colangiocelular con un grado variable de necrosis y apoptosis, 2) una infiltración de células inflamatorias (células mononucleares y células inmunocompetentes) y 3) la activación de diferentes células productoras de MEC, cuya actividad va a alterar su composición y sus características contráctiles [19].

La fibrogénesis es una respuesta multicelular cuyos principales efectores son las células estrelladas del hígado (HSC). Sin embargo, no son las únicas que participan en este proceso: tienen especial importancia las rutas de señalización inflamatorias que regulan interacciones intercelulares y el reclutamiento de células derivadas de la médula ósea (células madre mesenquimales y fibrocitos), los fibroblastos portales (especialmente en fibrosis biliar) y los fibroblastos derivados de la transición epitelio-mesénquima (EMT) [21, 26]. En condiciones fisiológicas, las HSC quiescentes (HSCq) residen en el compartimento perisinusoidal, conocido como “espacio de Disse”, entre hepatocitos y células endoteliales sinusoidales, presentan una acumulación de vitamina A y participan en la regulación del flujo de sangre sinusoidal [27]. Tras el daño hepático, las HSC reciben señales de los hepatocitos dañados y del entorno a través de citoquinas proinflamatorias [21] produciéndose la activación de las mismas y la transición de células quiescentes a miofibroblastos proliferativos activados (HSCa-MF). Estas células con características contráctiles y proinflamatorias van a liberar retinoide (vitamina A),

[20] y se va a producir un aumento característico de la expresión de  $\alpha$ -actina del músculo liso ( $\alpha$ -SMA) y COL1A1, dando lugar a la deposición de matriz fibrilar que sustituye a la regeneración del tejido. Además, van a liberar TIMPs 1 y 2 (inhibidores de tejido de metaloproteinasas 1 y 2), que bloquean la acción de las MMPs (metaloproteinasas de matriz), promoviendo así la acumulación de la MEC (Figura 5) [28, 29].

Una de las principales citoquinas que inducen la activación de las HSC y como consecuencia promueven el desarrollo de fibrosis es el TGF- $\beta$ 1 (factor de crecimiento transformador  $\beta$ 1). Se han descrito, sin embargo, otras numerosas citoquinas, quimioquinas y factores de crecimiento que también median este proceso, como PDGF (factor de crecimiento derivado de plaquetas), VEGF (factor de crecimiento endotelial vascular), TGF- $\alpha$  y factor de crecimiento de queratinocitos. Por otro lado, juega un papel muy importante el estrés oxidativo, ya que puede inducir muerte celular, infiltración inmune, esteatosis hepatocelular o actuar como un estimulador de las HSC, induciendo la fibrosis hepática. La apoptosis de los hepatocitos también presenta una gran importancia en el desarrollo de este proceso: está mediada por diversos estímulos, entre los que se encuentran Fas y TNF- $\alpha$  (factor de necrosis tumoral  $\alpha$ ). Por último, la inducción de estímulos proinflamatorios (TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ ) promueve el reclutamiento de neutrófilos y células T, estimulando la actividad pro-fibrótica de las HSC [29].

En el caso de las infecciones por virus de las hepatitis se va a



**Figura 5. Mecanismos moleculares de la fibrosis hepática.**

(A) Comparativa de tejido normal vs tejido hepático dañado. Imagen de Delgado-Coello B. et al., 2017 (B) Papel de las HSC en la fibrogenesis hepática. Adaptado de Zoubek, M.E. et al., 2017 [90].

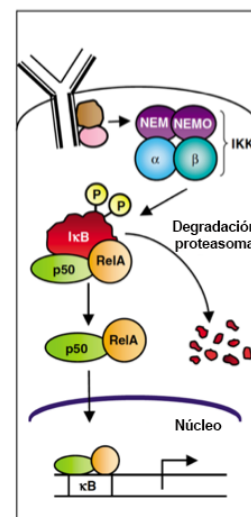
generar la infiltración de células inmunes que mediarán la destrucción de los hepatocitos infectados y la generación de citoquinas inflamatorias, como la familia de receptores de TNF (TNFR), que incrementan el daño hepático. La inflamación en este tipo de daño hepático juega un importante papel en la fibrogénesis: de esta manera la exposición a proteínas del VHC induce la expresión de componentes de la MEC y de sus citoquinas reguladoras (colágenos, TGF $\beta$ , CTGF) y una *up-regulación* de MMP-2 (indicador de la activación de las HSC); además de una *down-regulación* de metaloproteasas de la matriz con efecto fibrolítico como MMP-1; inducción de la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y *up-regulación* de citoquinas proinflamatorias como IL-1 $\beta$ , IFN, NF- $\kappa$ B, IL-20, IL-22 [19, 21].

Se han descrito también algunos genes que presentan una expresión diferencial entre estadios normales y cirrosis, tales como Aurora quinasa A (*AURKA*), marcador de proliferación Ki-67 (*MKI67*), *Baculoviral IAP Repeat Containing 5* (*BIRC5*), proteína asociada al ciclo de división celular 3 (*CDCA3*), ciclina E2, quinesina18A (*KIF18A*), complejo de proteínas asociado al centrómero (*NUF2*) y proteína asociada al nucleolo y al huso 1 (*NUSAP1*); que se asocian a una desregulación del ciclo celular, mitosis y otros procesos relacionados con el desarrollo de displasia a CHC [8].

### 2.1.1. RUTA DE SEÑALIZACIÓN NF- $\kappa$ B

La ruta de señalización de NF- $\kappa$ B está implicada en la regulación de la respuesta a diferentes situaciones de estrés celular, mediando en la respuesta inmune innata y en el proceso de inflamación [30]. Además, se ha descrito como este factor de transcripción interviene también en el control de la proliferación, actuando como un agente anti-apoptótico [31]. Se han descrito numerosas vías de activación de la ruta de señalización de NF- $\kappa$ B. En la vía de señalización canónica (*Figura 6*) los dímeros de NF- $\kappa$ B, formados por p50 y p65 (RelA), se encuentran en el citoplasma retenidos mediante la unión con el inhibidor I $\kappa$ B (Inhibidor de NF- $\kappa$ B), generalmente I $\kappa$ B $\alpha$ . La presencia de determinados estímulos va a desencadenar una cascada de señalización que desemboca en

la activación de las proteínas quinasas IKK (quinasa de I $\kappa$ B) que, una vez activadas, van a fosforilar al inhibidor I $\kappa$ B promoviendo su ubiquitinación y posterior degradación vía proteasoma. Una vez degradado el inhibidor, NF- $\kappa$ B entra al núcleo donde activa la transcripción de sus genes diana, mediando procesos implicados en inflamación,



**Figura 6. Vía de señalización de NF- $\kappa$ B.** Imagen modificada de Gilmore, T.D. et al., 2006 [32].

proliferación celular y apoptosis. Entre sus genes diana, se encuentra el gen de la ciclooxigenasa-2 (*COX-2*) y de esta manera, los estímulos proinflamatorios van a inducir la expresión de *COX-2* catalizando la producción de prostaglandinas, que promueven la inflamación. Existen otras rutas alternativas no canónicas que tienen lugar durante el desarrollo de las células B y T [32].

La vía de señalización de NF- $\kappa$ B se activa por daños en tejidos o por diferentes patógenos con el fin de proteger al organismo. Los virus durante la infección van a interferir y manipular la respuesta inmune de la célula huésped. La ruta de NF- $\kappa$ B es una de las principales dianas para la evasión de la respuesta inmune innata, y prueba de ellos son las numerosas estrategias que han desarrollado los distintos virus para contrarrestar esta ruta de señalización, afectando a la activación de la ruta o bien alterando alguno de los miembros de su cascada de señalización. NF- $\kappa$ B juega un papel clave en la regulación de la transcripción de genes en el sistema inmune innato, por lo que, al contrarrestar esta única vía, los virus interfieren con la defensa inmune de la célula huésped [33]. Estudios previos han descrito como el VHC activa la vía de señalización de NF- $\kappa$ B mediante dos mecanismos diferentes. Por un lado, la proteína core puede unirse a los receptores TNFR1 y LT $\beta$ R (*Lymphotoxin beta receptor*) dando lugar a la activación de la vía NF- $\kappa$ B y, consecuentemente, regulando la apoptosis; además core es capaz de promover la proliferación celular a través de la activación de la ruta de la ERK/MAPK mediante la *up-regulación* de la transcripción de *TGF $\alpha$*  que se produce como consecuencia de la activación de NF- $\kappa$ B. Por otro lado, NS5A induce estrés en el retículo endoplasmático promoviendo la activación de NF- $\kappa$ B mediante la fosforilación de I $\kappa$ B $\alpha$ . El VHC es capaz de evadir la inmunidad innata mediante una infección directa de las células inmunes como linfocitos B y T y monocitos/macrófagos, provocando la alteración de la expresión génica de mediadores inflamatorios clave. Se ha descrito también que la proteína viral core es capaz de suprimir la actividad de IKK $\beta$  inhibiendo la señalización mediada por NF- $\kappa$ B y, por lo tanto, la expresión de *COX-2* dependiente de la misma [16].

### **2.1.2. POLIMORFISMOS ASOCIADOS A HEPATITIS C CRÓNICA**

En hepatitis C crónica se han descrito polimorfismos presentes en el genoma del huésped que van a determinar cierta variabilidad en la progresión de la fibrogénesis [24, 25]. Numerosos estudios de asociación del genoma completo (GWAS) han identificado SNPs presentes en los genes IFNL3, IFNL4 y HDACs asociados con la respuesta al tratamiento con interferón (IFN), y otras variantes en el gen TLL1 se han relacionado con el desarrollo de CHC después de haber alcanzado la respuesta viral sostenida también con

terapias basadas en IFN. Por otro lado, se han identificado algunas variantes asociadas con la progresión de la fibrosis, como las presentes en el gen RNF7, que codifica para un antioxidante protector de la apoptosis, en los genes MERTK y TULP1, que codifican para factores involucrados en la fagocitosis de células apoptóticas y otros dos SNPs localizados en el gen que codifica para el antígeno mayor de histocompatibilidad de clase II (HLA class II). Además, usando una aproximación del gen candidato se han descrito polimorfismos presentes en genes que codifican para varias citoquinas y quimioquinas -como *IL6*, *CCL2*, *CCL8*, *TNF*, *IL10* y *TGFB1*- que también podrían tener implicación en la progresión de la enfermedad. También se han descrito varios SNPs relacionados con el desarrollo de CHC asociado a la infección crónica por VHC en los genes *DEPD5*, cuya *down-regulación* aumenta la síntesis de la MMP2 contribuyendo a la progresión de la fibrosis, y MICA, proteína de membrana que actúa como ligando de un receptor de las células NK (*natural killer*) y cuya *down-regulación* disminuye la actividad citotóxica de estas células inmunes [24, 34-36]. Por último, la presencia de determinadas mutaciones en los genes que codifican para las proteínas virales core, NS3, NS4 y NS5A se han asociado también con diferencias en la patogénesis del virus, ya que estas proteínas interaccionan con multitud de proteínas de la célula huésped modulando procesos como cascadas de señalización, reparación del DNA, regulación de transcripción y traducción y apoptosis entre otros [35].

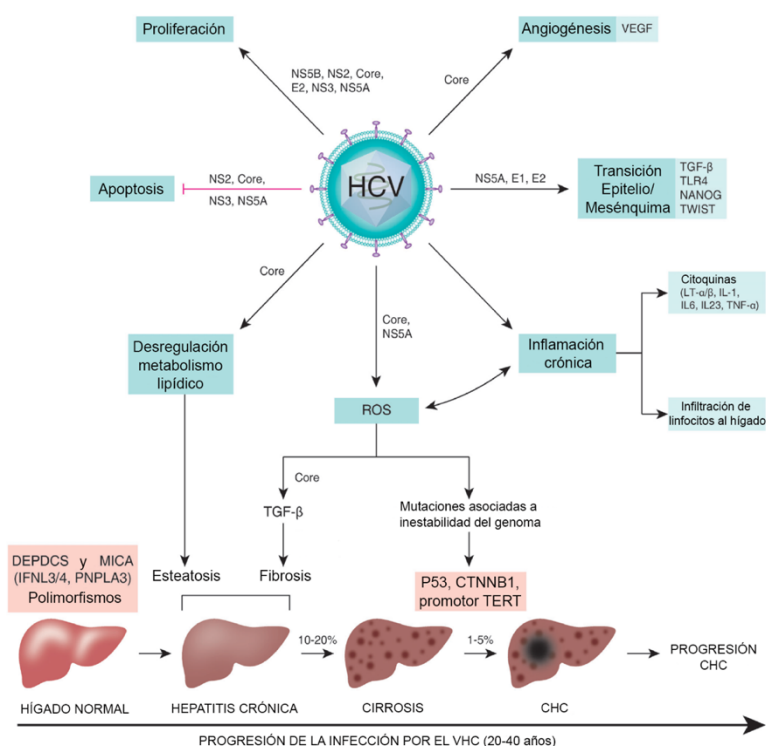
### 3. **CARCINOMA HEPATOCELULAR**

El carcinoma hepatocelular (CHC) es la última etapa en la progresión de la enfermedad hepática en un porcentaje significativo de pacientes con hepatitis crónica C. Es el quinto tipo de cáncer más común y la segunda causa de muerte relacionada con cáncer en algunos países como China. La infección crónica provocada por el VHC es una de las principales causas de desarrollo de CHC (la principal en el mundo occidental). En el año 2012 se estimó que alrededor de un 7.8% de todos los nuevos casos de cáncer eran atribuibles a la infección por el VHC [15, 37].

El proceso de hepatocarcinogénesis inducido tras la infección por el VHC es el resultado de la alteración de varias rutas de señalización, consecuencia tanto de la acción directa de factores virales como del estado crónico de inflamación generado por la infección [38, 39]. Durante el proceso de inflamación crónica, el hígado va a estar expuesto de manera persistente a unos niveles elevados de citoquinas proinflamatorias y a la evolución de la fibrosis a estadios cada vez más avanzados. La respuesta del tejido hepático, en un intento por reestablecer el tejido perdido y recuperar su funcionalidad, puede dar lugar a un crecimiento

anormal desembocando en cirrosis y/o CHC [31, 40]. El desarrollo de CHC que se produce como consecuencia de un proceso inflamatorio tiene lugar cuando algunas de las células presentes en los nódulos de regeneración de un hígado cirrótico acumulan determinadas mutaciones que provocan la transformación celular. El entorno que genera la presencia de cirrosis en el hígado se piensa que contribuye a la generación de clones neoplásicos facilitando la aparición de alteraciones genéticas y la transformación celular, generando el desarrollo de CHC [41].

Aunque en la mayoría de los pacientes el desarrollo de CHC se asocia a la progresión de la fibrosis hepática y el desarrollo previo de cirrosis; existen, sin embargo, evidencias de un papel directo del virus en el desarrollo de CHC; estudios *in vitro* han revelado la interacción de proteínas codificadas por el virus C con proteínas supresoras de tumores



**Figura 7. Mecanismos carcinogénicos mediados por el VHC.** Figura adaptada de Axley, P. et al., 2018 [15].

que afectan a procesos celulares básicos (Figura 7) como el control del ciclo celular (NS5B inhibe la proteína del Retinoblastoma (RB) implicada en el control del ciclo celular; NS2 activa el complejo Ciclina D/Cdk4, promoviendo la transición G1/S y core promueve la expresión de ciclina E/Cdk2 asegurado la progresión del ciclo celular), respuesta a factores de crecimiento (Core, E2, NS3 y NS5A activan constitutivamente las vías de señalización de factores de crecimiento interfiriendo con vías de señalización RAF/MAPK/ERK; core y NS5A están implicadas en la desregulación de la ruta Wnt/ $\beta$ -catenina), respuesta a daño en el DNA y apoptosis (NS2, NS3/4A, NS5A y core afectan la regulación de la apoptosis mediante la alteración de la ruta p53/ARF, alterando la señalización mediada por TNF- $\alpha$  o bien a través de la estimulación de la vía PI3K-Akt), EMT (core y NS5A afectan a la señalización mediada por TGF- $\beta$ ), autofagia (inducida por la infección viral) y generación de ROS (core y NS5A aumentan el estrés oxidativo afectando a la cadena transportadora de electrones en la mitocondria y a la liberación de calcio desde el retículo respectivamente) [15, 39, 42, 43].

Además de los factores genéticos e inmunológicos asociados al desarrollo de fibrosis, se ha confirmado que el desarrollo de un proceso carcinogénico se asocia también a la acumulación de defectos epigenéticos en la célula huésped, que dan lugar a una activación o inactivación anormal de las rutas de señalización implicadas en los procesos de proliferación, supervivencia celular, diferenciación y angiogénesis, promoviendo el desarrollo de CHC [43].

#### **4. EPIGENÉTICA EN EL DESARROLLO DE FIBROSIS Y CARCINOMA HEPATOCELULAR**

La epigenética es una ciencia basada en el estudio de alteraciones en el DNA que no implican cambios en la secuencia de nucleótidos, pero modifican la estructura de la cromatina afectando a la regulación de la expresión génica [44]. Hay tres tipos principales de modificaciones epigenéticas potencialmente heredables: metilación del DNA, modificaciones postraduccionales de histonas y RNAs no codificantes [45]. Estos cambios persisten en las células durante la división celular aunque no haya cambios en la secuencia del DNA [46].

Se han descrito numerosas alteraciones epigenéticas que promueven el desarrollo de un proceso fibrótico o incluso de carcinogénesis [47]. De manera general, durante un proceso tumoral se va a producir una hipometilación global del genoma afectando a secuencias repetitivas del genoma y zonas con elementos transponibles, hipermetilación de las islas CpG de las regiones promotoras de genes supresores de tumores, alteraciones de la estructura de la cromatina y pérdida del *imprinting* generando inestabilidad genómica y contribuyendo al proceso de tumorigénesis [48].

Se ha descrito también la aparición de alteraciones epigenéticas como consecuencia de infecciones virales y en respuesta a la exposición a determinados factores ambientales; la naturaleza de estas alteraciones va a variar en función del factor de riesgo que lo desencadene [43, 49]. Sin embargo, existen muy pocos datos acerca de las modificaciones en los procesos epigenéticos celulares asociados a la infección por VHC, especialmente sobre las modificaciones postraduccionales de las histonas, así como de los mecanismos moleculares implicados, y lo que es más importante, del efecto que estos pudieran tener sobre la progresión de la fibrosis hepática.

##### **4.1. MODIFICACIONES COVALENTES DE HISTONAS**

Las modificaciones postraduccionales de las histonas, junto con el estado de metilación del DNA, determinan procesos como la expresión génica, la organización de la cromatina y la



identidad celular. Las modificaciones postraduccionales que sufren las histonas almacenan la memoria epigenética dentro de la célula en forma de código, el llamado “código de histonas”, que contribuye a la identidad celular [48].

La unidad fundamental de empaquetamiento de la cromatina son los nucleosomas, constituidos por octámeros de histonas (dos dímeros H2.A-H2.B y un tetrámero H3-H4) alrededor de los cuales se enrollan 147 pb de DNA; separados uno de otro por 50 pb de DNA libre, donde se puede unir la histona H1. Las histonas son proteínas esencialmente globulares, con una cola amino terminal donde tienen lugar la mayoría de las modificaciones postraduccionales. Existe una amplia variedad de modificaciones a las que están sujetos los residuos de las colas N-terminal de las histonas: acetilación, metilación, fosforilación, ubiquitinación, SUMOilación y ADP-ribosilación. Estas modificaciones covalentes tienen un importante papel en la regulación de la expresión génica, pero también en los procesos de reparación y replicación del DNA, *splicing* alternativo y condensación cromosómica. Según el código de histonas, la eucromatina se caracteriza por tener altos niveles de acetilación y trimetilación de los residuos H3K4, H3K36 y H3K79; y la heterocromatina sin embargo suele estar asociada a bajos niveles de acetilación y altos niveles de metilación en H3K9, H3K27 y H4K20. Por otro lado, genes activamente transcritos se caracterizan por tener altos niveles de H3K4me3, H3K27ac, H2BK5ac y H4K20me1 en el promotor y H3K27me1 y H4K20me1 a lo largo del cuerpo génico. La presencia de estas modificaciones es muy dinámica, y la mayoría de estos cambios son reversibles, ya que están mediados por parejas de actividades enzimáticas: acetil transferasas (HATs) – desacetilasas (HDACs), metil transferasas (HMTs) – desmetilasas (KDMs), quinasas (AURKB, MSK1, RSK2, etc.) – fosfatasas (PP1, PP2A, etc.) [46, 48].

#### **4.1.1. MODIFICACIONES COVALENTES DE HISTONAS EN FIBROSIS Y CHC**

La mayoría de las alteraciones de las modificaciones de histonas asociadas a fibrosis y CHC tienen como consecuencia la alteración en la expresión de genes celulares críticos que afectan actividades celulares necesarias para el funcionamiento normal de la célula. En CHC se ha descrito la deacetilación de las histonas H3 y H4, asociada con la represión de la expresión de numerosos genes [50]. Esta marca epigenética es controlada por acetilasas y deacetilasas de histonas, y el tratamiento con un inhibidor de las HDACs como TSA (Tricostatina A), provoca la *up-regulación* de 57 genes, algunos de ellos relacionados con CHC. Además, en este tipo de carcinoma, la metilación de histonas también está implicada en el silenciamiento génico, afectando a genes supresores de tumores tales como RIZ12, p16Ink4 y RASSF1A. Se ha descrito un aumento significativo en los niveles de metilación de los residuos H3K9 y H3K27 en la región promotora de estos genes [50-52].



A nivel global también se han descrito numerosas alteraciones en las modificaciones postraduccionales de histonas, entre las que se encuentran una disminución en los niveles de H4K20me3 y un aumento en los niveles de H3K27me3 y en la fosforilación de la histona H3 en los tejidos tumorales en relación con los tejidos adyacentes [53-55].

Numerosas actividades enzimáticas modificadoras de histonas aparecen significativamente desreguladas en CHC. En primer lugar, se ha descrito una expresión elevada de las histonas deacetilasas HDAC1, HDAC2 y HDAC3, que se correlaciona con un fenotipo más agresivo de CHC [56]. En segundo lugar, se observa de manera frecuente una baja expresión del complejo ASH2 y de la demetilasa LSD1. Como consecuencia, se observan bajos niveles de la H3K4me2 [57]. También se ha descrito un aumento en la expresión de EZH2, subunidad catalítica de PRC2 (Complejo represor del Polcomb 2), histona metil-transferasa responsable de la H3K27me3, marca asociada al silenciamiento génico afectando a la vía de señalización de Wnt/ $\beta$ -catenina, relacionada con un peor pronóstico [53, 58-60]. Por otro lado, se ha observado una *up-regulación* de SMYD3, histona metiltransferasa responsable de la metilación de H3K4, marca relacionada con la activación génica, afectando a genes como NKX2-8, frecuentemente *up-regulado* en CHC y asociado con un aumento de la proliferación. Además, se ha descrito una *down-regulación* de RIZ1, que podría mediar la disminución en H3K9me3 observada en CHC, contribuyendo a la descondensación de la cromatina y a la inestabilidad genética [61, 62].

En fibrosis también se ha descrito la desregulación de actividades enzimáticas modificadoras de histonas asociadas a fibrosis, tales como un aumento en la expresión de la metiltransferasa ASH1, responsable de la metilación de H3K4 y H3K36 activando la expresión de genes profibrogénicos como *COL1A1*,  *$\alpha$ -SMA*, *TIMP1* y *TGF- $\beta$ 1*; aumento en la expresión de la metiltransferasa EZH2 y disminución de JMJD1A, demetilasa de la H3K9, provocando el silenciamiento de *PPAR $\gamma$* . También se ha descrito el aumento en las HDACs, concretamente de la HDAC1, implicadas en la transdiferenciación de las HSC y en la expresión de genes profibróticos (*NF- $\kappa$ B*, *COL1A1* y *TGF- $\beta$ 1*) [63, 64].

### **4.1.2. MODIFICACIONES COVALENTES DE HISTONAS EN HEPATITIS C CRÓNICA**

La infección por el VHC afecta a la expresión de la PP2A (Proteína fosfatasa 2A) induciendo su sobreexpresión y promoviendo su unión a la PRMT1 (Proteína metiltransferasa de arginina 1) y la inhibición de su actividad [39, 65]. Esta enzima cataliza la metilación de la histona H4 en la arginina 3; la PP2A juega también un importante papel en la reparación del DNA mediante la desfosforilación de la H2AX. Esta marca epigenética es inducida en respuesta a daño en el DNA, por lo que, al desfosforilarla, el proceso de

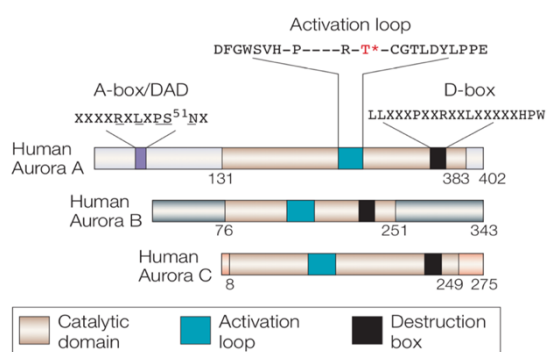
reparación va a estar inhibido [65]. Además, se ha descrito como la infección por el VHC provoca la alteración de EZH2, cuya desregulación afecta a la expresión de miRNAs supresores de tumores [39]. Por otro lado, también se ha observado en células de hepatoma infectadas con el VHC alteraciones en el ciclo celular a la entrada de mitosis, reflejado por una disminución en los niveles de histona H3 fosforilada en el residuo de serina 10 (H3Ser10ph) [66].

Hung S. Y. et al, 2014 [58] observaron que un total de 24 genes estaban 8 veces sobreexpresados en tejidos de CHC asociados a la infección por VHC. Entre estos genes había algunos implicados en las modificaciones postraduccionales de histonas, como la AURKB (quinasa responsable de la fosforilación de la histona H3), EZH2, G9a y Suv39H2, metilasas de histonas en residuos de lisina y arginina; esta última la única significativamente asociada con la infección por VHC y CHC.

## 5. **AURORA QUINASA B**

El correcto funcionamiento del ciclo celular depende de proteínas reguladoras como las quinasas dependientes de ciclinas (CDKs), Polo-like quinasas (PLKs) y Aurora quinasas, que controlan la entrada a mitosis y su correcta progresión. Los defectos en estas quinasas son causantes de aneuploidías y tumorigénesis [67]. La familia de Aurora quinasas está compuesta por tres miembros: Aurora A, B y C; cada uno con diferente localización y funciones [68, 69]. Las tres quinasas poseen un dominio catalítico muy conservado y un dominio N-terminal que varía en secuencia y longitud (*Figura 8*).

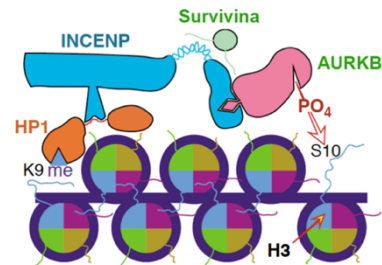
Numerosos estudios han descrito la sobreexpresión de estas quinasas en diferentes tipos de cáncer, incluyendo CHC [70, 71]. De hecho, se han diseñado diversos inhibidores de estas quinasas como moléculas con potencial anticancerígeno, ya que no solo son de vital importancia como reguladores del proceso de mitosis, sino que además se ha descrito que interaccionan con múltiples oncoproteínas y proteínas supresoras de tumores [72, 73]. Los niveles



**Figura 8. Estructura primaria de las proteínas Aurora quinasas.** Representación esquemática de la estructura primaria de las proteínas quinasas humanas Aurora-A, -B y -C. Se representan las localizaciones de los dominios catalíticos, de activación, y de destrucción en las 3 proteínas. Imagen de Carmena, M. et al., 2003 [69].

de RNA mensajero y de proteína de la AURKB están estrictamente regulados durante el ciclo celular, su expresión aumenta durante G2/M y decae rápidamente al final de la mitosis, donde el complejo APC/C<sup>Cdh1</sup> media su degradación [70].

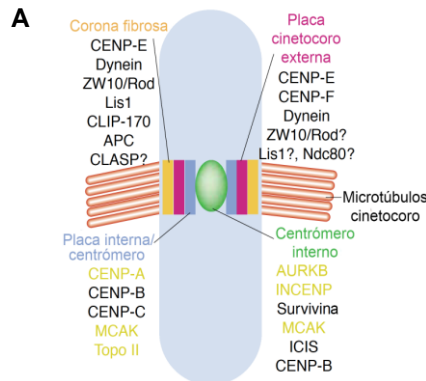
La AURKB forma parte del complejo pasajero del cromosoma (CPC), junto con Borealina, Survivina e INCENP (proteína del centrómero interno) y se localiza en el núcleo en profase, en el centrómero durante la mitosis temprana -prometáfase y metafase- y después en el huso mitótico durante la anafase y telofase, donde interviene para asegurar la correcta orientación de los cromosomas y finalmente se redirige al anillo contráctil donde media la regulación de los procesos de citocinesis y segregación cromosómica [71, 74].



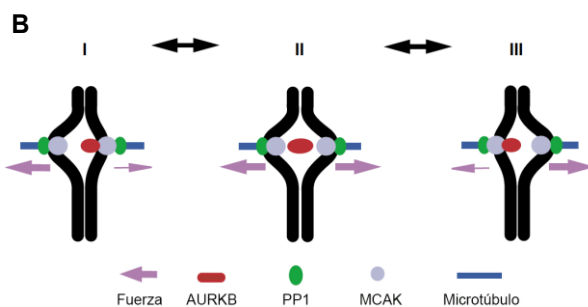
**Figura 9. Papel del CPC en los cromosomas.** Figura adaptada de Adams, R.R. et al., 2001 [76].

La AURKB participa como quinasa en al menos tres funciones distintas:

1.- Fosforilación de la histona H3 en los residuos de Ser10 y Ser28 y en el residuo de Ser7 de INCENP, eventos necesarios para la condensación de los cromosomas. INCENP interacciona con la HP1 (proteína de la heterocromatina 1), que se une específicamente a H3K9me. La AURKB se une a INCENP y lleva a cabo la fosforilación de la H3Ser10, es posible que esta fosforilación sirva para estabilizar la asociación del CPC a los centrómeros [75, 76] (Figura 9). La fosforilación de la histona H3 en los residuos de Ser10 y Ser28 es por tanto una marca asociada al inicio de la mitosis [77].



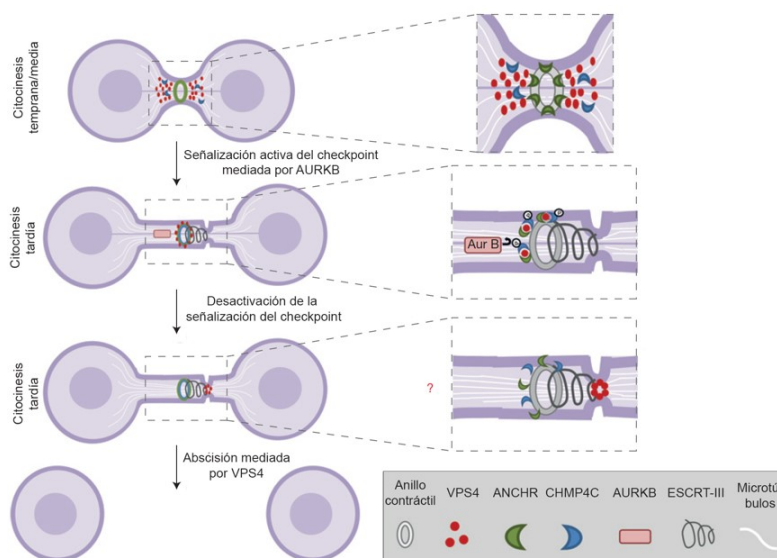
2.- *Checkpoint* del huso mitótico, el CPC es transferido a la zona media a través de la unión de INCENP a los microtúbulos con el fin de controlar la tensión y corregir defectos en el anclaje de los cromosomas al huso mitótico (Figura 10 A). Existe una interacción dinámica entre la AURKB, la depolimerasa de microtúbulos MCAK (quinesina asociada al centrómero mitótico) y la fosfatasa PP1, que constituyen un tensiómetro dependiente de fosforilación. Como se observa en la figura 10 B, la



**Figura 10. Checkpoint del huso mitótico** (A) Organización del centrómero interno, centrómero y cinetocoro. Los sustratos de AURKB se muestran en amarillo. (B) Representación esquemática de la interacción dinámica entre AURKB, PP1 y MCAK. Imágenes adaptadas de Andrews, P.D., et al., 2003 [78].

AURKB tiene una posición metaestable, de manera que en I y III, la localización asimétrica de la AURKB en el eje del centrómero da lugar a una fosforilación asimétrica de MCAK, generando una tensión asimétrica y provocando el movimiento direccional de los cromosomas. La fosforilación de MCAK inactiva su actividad catalítica inhibiendo la despolimerización de los microtúbulos, por lo que el cinetocoro que se encuentra más alejado de la AURKB genera más fuerza de manera transitoria y la tensión a ambos lados se equilibra (II). Si la actividad de AURKB se inhibe o su posición se fija podrían ocurrir errores en la segregación de los cromosomas [78].

3.- Citocinesis, donde la AURKB interacciona con ZEN-4/MKLP1, quinesina que a su vez interacciona con PLK1 (*polo-like kinase*) y CYK-4, una GTPasa que actúa sobre RhoA mediando su movimiento durante la citocinesis. También fosforila a la vimentina, que participa en la formación del anillo contráctil del surco de escisión. Durante la



**Figura 11. Checkpoint de abscisión.** Imagen adaptada de Thoresen, S. B., et al., 2014 [79].

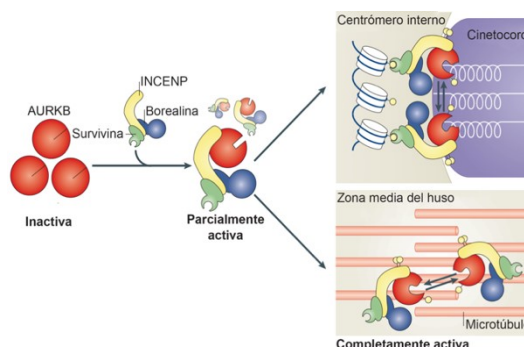
citocinesis, la abscisión final de la membrana es mediado por el complejo ESCRT-III (complejo de clasificación endosómico requerido para el transporte III) mediante la actividad de la ATPasa VPS4 (proteína de clasificación vacuolar 4). En este punto hay un *checkpoint* de abscisión (*NoCut*) con el fin de evitar defectos en la segregación cromosómica que se generan como consecuencia de la aparición de puentes de cromatina, ya que en el caso de que el proceso de división continuara sin resolverlo, provocaría la aparición de aneuploidías y acumulación de daño en el DNA. Como se observa en la figura 11, la AURKB también desempeña una importante función en el *checkpoint* de abscisión fosforilando a la proteína CHMP4C (proteína del cuerpo multivesicular cargado 4C) que, junto con ANCHR (Regulador del *checkpoint* de abscisión/*NoCut*), retienen a VPS4 en el cuerpo medio del anillo. Una vez la AURKB es inactivada porque se ha resuelto el evento que activaba el *checkpoint* (por ejemplo, un puente de cromatina), la desfosforilación de CHMP4C provoca la disociación del complejo

ANCHR-CHMP4C-VPS4, liberando VPS4, que se relocaliza en la zona de abscisión mediando la división de las dos membranas a través de ESCRT-III [79, 80].

Durante todas estas etapas, la actividad de la AURKB está regulada por numerosas quinasas y fosfatasas [75]. Su activación tiene lugar en dos pasos: en primer lugar, la quinasa se une al dominio C-terminal de INCENP a través de la altamente conservada *IN-box*.

Esta unión desencadena la autofosforilación de la AURKB en el residuo de treonina 232

presente en su dominio de activación, provocando la estabilización de una conformación abierta de la cola C-terminal de la quinasa. En un segundo paso, Aurora B fosforila a INCENP en dos residuos de serina adyacentes en la secuencia TSS. Esta fosforilación da lugar a la liberación de la AURKB, con la actividad quinasa parcialmente activa (Figura 12). Por otro lado, las fosfatasas PP1 y PP2A interaccionan con la AURKB defosforilándola e inhibiendo su actividad [75]. Adicionalmente, la AURKB es fosforilada en el residuo de serina 331. La fosforilación en este residuo es esencial para la completa activación de la AURKB y es llevada a cabo por las quinasas CHK2 durante la prometafase temprana, CHK1 durante la prometafase tardía y la metafase (dos quinasas que juegan un importante papel en los *checkpoints* que regulan el daño y la replicación del DNA) [81, 82]; y también puede ser llevada a cabo por las quinasas CLKs 1, 2 y 4 durante etapas finales de la citocinesis para activar el *checkpoint* de abscisión *NoCut* [83].



**Figura 12. Esquema activación AURKB.** Imagen adaptada de Carmena, M. et al., 2003 [69].

## 5.1. POLIMORFISMOS EN LOS GENES DE LA AURORA QUINASA

Existen numerosos estudios GWAS que tratan de establecer una relación entre los polimorfismos presentes en los genes codificantes de la familia de Aurora quinasas y el desarrollo de diferentes tipos de cáncer, debido a que estas proteínas juegan un importante papel como reguladoras del proceso de mitosis. En este sentido, se ha analizado la implicación en cáncer de mama observando como en la posición rs2241909 del gen *AURKB*, el alelo C en homocigosis presenta asociación con un mayor riesgo de cáncer de mama, mientras que rs1059476 (*AURKB*) y rs2273535 (*AURKA*) no presentan ninguna relación [68]. Estos mismos polimorfismos se analizaron también en cáncer de colon observándose en este caso como la presencia del alelo C en rs2241909 mostraba una reducción significativa de la supervivencia global [84].

También se ha analizado la asociación de polimorfismos en genes de Aurora quinasas con el porcentaje de densidad mamográfico, observándose una asociación consistente de los SNPs rs4792590 y rs302726, ambos localizados en el gen de la *AURKB*; sin embargo, la asociación no fue estadísticamente significativa [85]. Por otro lado, en los trabajos de Mesic, A. et al [86, 87] se ha analizado la asociación de SNPs presentes en los genes de la familia de Aurora quinasas con la susceptibilidad de desarrollar cáncer gástrico. Concretamente, se genotiparon los SNPs en los genes de *AURKA* (rs2273535, rs1047972, rs911160, rs8173), *AURKB* (rs2241909, rs2289590) y *AURKC* (rs758099, rs11084490), observándose asociación en el caso de rs1047972 (*AURKA*), rs2289590 (*AURKB*) y rs758099 (*AURKC*).

| Referencia                     | Gen          | SNP       | Tipo de cáncer     |
|--------------------------------|--------------|-----------|--------------------|
| Tchatchou, S. et al, 2007 [68] | <i>AURKB</i> | rs2241909 | Cáncer de mama     |
| Pohl, A. et al, 2011 [84]      | <i>AURKB</i> | rs2241909 | Cáncer colorrectal |
| Vachon, C.M. et al, 2012 [85]  | <i>AURKB</i> | rs4792590 | Cáncer de mama     |
|                                | <i>AURKB</i> | rs302726  |                    |
|                                | <i>AURKA</i> | rs911160  |                    |
| Mesic, A. et al, 2017 [86]     | <i>AURKB</i> | rs2289590 | Cáncer gástrico    |
|                                | <i>AURKB</i> | rs2289590 |                    |
| Mesic, A. et al, 2016 [87]     | <i>AURKA</i> | rs1047972 | Cáncer gástrico    |
|                                | <i>AURKC</i> | rs758099  |                    |

**Tabla 1. Estudios de asociación de polimorfismos en los genes de las Aurora quinasas con diferentes tipos de cáncer**

En el caso del gen de la *AURKB*, los únicos SNPs descritos en la región codificante son rs2241909 y rs1059476. Estos SNPs muestran un elevado desequilibrio de ligamiento [84] y tan solo uno de ellos, rs2241909, se ha relacionado en la literatura con la susceptibilidad de desarrollar cáncer de colon y mama; mientras que en el caso de rs1059476 no se ha descrito ninguna asociación hasta el momento.

## **6. TRATAMIENTOS DE LA HEPATITIS C Y REVERSIÓN DE LA FIBROSIS**

Durante la última década, la terapia para la infección por el VHC se basaba en un régimen de interferón pegilado (PEG-IFN- $\alpha$ ) en combinación con ribavirina (RBV), un análogo de nucleósido. Con estas terapias se obtenía una tasa de respuesta viral sostenida (RVS) del 42-52% y 76-82% en individuos infectados con los genotipos virales 1 y 4, y 2 y 3, respectivamente. La aparición de los nuevos tratamientos, antivirales de acción directa (DAAs), con una tasa de RVS superior al 95%, ha provocado un cambio drástico en el panorama actual de la hepatitis C. Estos antivirales inhiben diferentes proteínas virales específicamente: la proteasa NS3/4a (boceprevir, telaprevir, simpeprevir, paritaprevir, grazoprevir), el complejo de la NS5A (daclatasvir (DCV), ledipasvir, velpatasvir, elbasvir, pibrentasvir) y la polimerasa NS5B

(sofosbuvir (SOF)). Si bien no se puede hablar de erradicación de la enfermedad, ya que no existe la vacuna frente al VHC, la eliminación en muchas áreas sí puede considerarse un objetivo cercano, y en este sentido la OMS sitúa el horizonte de eliminación en el año 2030 [11, 88].

El objetivo último del tratamiento antiviral es detener la progresión de la fibrosis hepática y, si fuera posible, la regresión del daño generado a formas menos severas de fibrosis. En este sentido, existen evidencias que indican que en el curso de una enfermedad crónica la arquitectura hepática está bajo constante remodelación, con procesos constantes de progresión y regresión de la fibrosis reflejando un balance entre el daño y la reparación. Cuando el estímulo que está generando el daño es eliminado, los mecanismos de regresión de la fibrosis pueden mejorar la histología hepática, de manera que los septos fibrosos se vuelvan más finos y perforados, los nódulos incipientes puedan llegar a desaparecer, se produzca la aparición de fibras de colágeno aisladas, etc. [89]. La reversión depende de varios factores: 1) que se elimine la causa principal que causa el daño hepático; 2) la regresión del estado activado de los miofibroblastos y/o su eliminación mediante apoptosis de las HSC; 3) la degradación del exceso de MEC y 4) una reducción de la inflamación [90]. Sin embargo, y a pesar de que en la mayoría de los pacientes respondedores a tratamiento se produce una parada en la progresión de la fibrosis hepática e incluso reversión de la misma, existe actualmente cierta controversia sobre el efecto de la eliminación del virus en algunos pacientes y la recurrencia de CHC. En este sentido, el tratamiento con DAAs no provoca un aumento en el riesgo de aparición de CHC *de novo* en pacientes cirróticos con hepatitis C, sin embargo, parece tener un efecto en la recurrencia del CHC en pacientes con historias de CHC previo tratado y curado, con unos porcentajes de recurrencia variables según los diferentes estudios, llegando a alcanzar un 30% en algunos de ellos [88, 91].

Un factor a tener en cuenta en la evolución de la enfermedad hepática post-tratamiento y que podría estar en la base de las observaciones realizadas es la evolución de las marcas epigenéticas una vez eliminado el estímulo que produjo su inducción. Las modificaciones postraduccionales de las histonas son cambios reversibles, por lo que cabría esperar que vayan desapareciendo cuando se eliminan los factores desencadenantes. No obstante, otros tipos celulares como en las células T del sistema inmune, pueden mantener la memoria inmune a través de cambios epigenéticos que se mantienen y generan un estado susceptible de activación ante estímulos similares a los que generaron dichos cambios [92, 93].

---

# OBJETIVOS

---



El principal objetivo de esta tesis es analizar si la infección por el VHC induce cambios epigenéticos en las histonas que afectan al desarrollo de fibrosis y/o carcinoma hepatocelular.

Para ello se plantean los siguientes objetivos secundarios:

1. Analizar el efecto de la infección por el VHC sobre las modificaciones postraduccionales de las histonas.
2. Determinar las actividades enzimáticas responsables de las alteraciones epigenéticas observadas, así como las proteínas virales a través de las cuales el virus media su efecto.
3. Analizar el efecto de las modificaciones epigenéticas sobre la regulación de la expresión de genes relacionados con la respuesta inflamatoria y el desarrollo de fibrosis.
4. Determinar el efecto de la eliminación de la infección por VHC por el tratamiento antiviral con DAAs en la reversión de los cambios epigenéticos inducidos por el VHC.
5. Analizar la correlación de los polimorfismos de las actividades enzimáticas celulares implicadas en la regulación de las modificaciones postraduccionales de las histonas inducidas por VHC y su asociación con la progresión de la enfermedad hepática en pacientes con hepatitis C crónica.

---

# **MATERIALES Y MÉTODOS**

---

## 1. REACTIVOS

### 1.1. ANTICUERPOS

Los anticuerpos fueron adquiridos en Abcam (Cambridge, Reino Unido), Calbiochem/Merk Millipore (Billerica, Massachusetts, EEUU), Cell Signaling Technology (Sanvers, MA, EEUU) Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, EEUU), Sigma-Aldrich (St. Louis, MO; EEUU), Rockland (Limerick, PA, EEUU), Li-cor (Lincoln, NE, EEUU) y Thermo Fischer Scientific (Waltham, Massachusetts, EEUU).

| PRIMARIOS                  | Casa comercial            | Referencia    | Origen | Dilución WB | Dilución IF |
|----------------------------|---------------------------|---------------|--------|-------------|-------------|
| Core                       | Santa Cruz                | sc-69937      | Mouse  | 1/1000      | 1/100       |
| NS5A                       | Santa Cruz                | sc-65458      | Mouse  | 1/1000      |             |
| HA                         | Clontech                  | #631207       | Rabbit | 1/2000      | 1/200       |
| H3Ser10ph                  | Millipore                 | 06-570        | Rabbit | 1/1000      | 1/100       |
| H3K9me2                    | Millipore                 | 07-441        | Rabbit | 1/1000      |             |
| H3K9me3                    | Millipore                 | 07-523        | Rabbit | 1/1000      |             |
| H3K4me2                    | Millipore                 | 07-030        | Rabbit | 1/1000      |             |
| H3Ac                       | Millipore                 | 06-599        | Rabbit | 1/1000      |             |
| H3 total                   | Millipore                 | 06-755        | Rabbit | 1/1000      |             |
| β-Actina                   | Santa Cruz                | sc-1615       | Goat   | 1/1000      |             |
| α-Tubulina                 | Sigma-Aldrich             | T8328         | Mouse  | 1/1000      | 1/200       |
| GAPDH                      | CalBiochem                | #CB1001       | Mouse  | 1/1000      |             |
| AURKB                      | abcam                     | ab2254        | Rabbit | 1/1000      | 1/100       |
| pAURKB                     | Rockland                  | #600-401-677S | Rabbit | 1/1000      |             |
| pMSK-1                     | Cell Signalling           | #9595         | Rabbit | 1/1000      |             |
| phChk1                     | Cell Signalling           | #2341         | Rabbit | 1/1000      |             |
| PARP                       | Santa Cruz                | sc-7150       | Rabbit | 1/1000      |             |
| Caspase3                   | Santa Cruz                | sc-1225       | Goat   | 1/1000      |             |
| DNMT3A                     | Santa Cruz                | sc-20703      | Rabbit | 1/1000      |             |
| DNMT1                      | Epigentek                 | mAb 60B122.1  | Mouse  | 1/1000      |             |
| HDAC1                      | Santa Cruz                | sc-7872       | Rabbit | 1/1000      |             |
| SECUNDARIOS                | Casa comercial            | Referencia    |        | Dilución WB | Dilución IF |
| Goat anti-mouse IgG        | Li-cor                    | P/N 925-32210 |        | 1/10000     |             |
| Goat anti-rabbit IgG       | Li-cor                    | P/N 925-68021 |        | 1/10000     |             |
| Goat anti mouse-Alexa 488  | Thermo Fischer Scientific | A11029        |        |             | 1/200       |
| Goat anti rabbit-Alexa 546 | Thermo Fischer Scientific | A11035        |        |             | 1/200       |

Tabla 2: Listado de anticuerpos usados en Western blot e inmunofluorescencia.

**1.2. PLÁSMIDOS**

| VECTORES DE EXPRESIÓN EUCARIOTA   |
|---|
| <p><b>pCMV-HA-N:</b> vector de expresión eucariota de mamíferos que contiene el promotor de CMV para la sobreexpresión de proteínas y un tag de HA en el extremo N-terminal para su detección.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ pCMV-HA-core1a: cDNA de la proteína core del VHC del genotipo 1a.</li> <li>○ pCMV-HA-core1b: cDNA de la proteína core del VHC del genotipo 1b.</li> <li>○ pCMV-HA-core2a: cDNA de la proteína core del VHC del genotipo 2a.</li> <li>○ pCMV-HA-AURKB C/T: cDNA de la proteína AURKB wt.</li> <li>○ pCMV-HA-AURKB C/C: cDNA de la proteína AURKB con la mutación puntual p.M298T.</li> </ul> <p><b>pCDNA3.1v5-His(A)-0:</b> vector de expresión eucariota de mamíferos que contiene el promotor de CMV para la sobreexpresión de proteínas y un tag de Histidinas en el extremo C-terminal para su detección.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ pCDNA3.1v5-His(A)-AURKB C/T: cDNA de la proteína AURKB wt.</li> <li>○ pCDNA3.1v5-His(A)-AURKB C/C: cDNA de la proteína AURKB con la mutación puntual p.M298T.</li> <li>○ pCDNA3.1v5-His(A)-AURKB T/T: cDNA de la proteína AURKB con la mutación puntual c.1007C&gt;T.</li> <li>○ pCDNA3.1v5-His(A)-AURKB T/C: cDNA de la proteína AURKB con las mutaciones c.1007C&gt;T y p.M298T.</li> <li>○ pCDNA3.1His(A)-core1b: cDNA de la proteína core del VHC del genotipo 1b.</li> <li>○ pCDNA3.1His(A)-core1b (1-122): cDNA del mutante de delección I123_A191del de la proteína core del VHC del genotipo 1b.</li> </ul> |
| VECTORES DE EXPRESIÓN BACTERIANA  |
| <p><b>pGEX4T1-0:</b> vector del sistema <i>Glutathione S-transferase (GST) Gene Fusion System</i> para la expresión y purificación de proteínas de fusión GST producidas en <i>Eschericia coli</i> (<i>E. coli</i>).</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ pGEX4T1-AURKB C/T: cDNA de la proteína AURKB wt.</li> <li>○ pGEX4T1-AURKB (1-250): cDNA del mutante de delección AURKB N251_A344del, que codifica por los 250 primeros aminoácidos de la AURKB.</li> <li>○ pGEX4T1-AURKB (1-75): cDNA del mutante de delección AURKB D76_A344del, que codifica por los 75 primeros aminoácidos de la AURKB.</li> <li>○ pGEX4T1-AURKB C/C: cDNA de la proteína AURKB con la mutación puntual p.M298T.</li> <li>○ pGEX4T1-AURKB T/T: cDNA de la proteína AURKB con la mutación puntual c.1007C&gt;T.</li> <li>○ pGEX4T1-AURKB T/C: cDNA de la proteína AURKB con las mutaciones c.1007C&gt;T y p.M298T.</li> <li>○ pGEX4T1-CHMP4C: cDNA de la proteína CHMP4C.</li> </ul>   |
| PLÁSMIDOS REPORTERS   |
| <p><b>pRL-TK:</b> vector que contiene el gen testigo de la luciferasa renila bajo el control del promotor de la Timidina quinasa del virus del Herpes simplex (HSV), de expresión constitutiva. Es usado en experimentos como plásmido <i>reporter</i> control para normalizar la expresión del gen experimental.</p> <p><b>3xNF-κB-luc:</b> plásmido <i>reporter</i> que contiene el gen testigo de la luciferasa (pGL3basic) fusionado con 3 copias del promotor de NF-κB.</p> <p><b>p-COX-2-luc:</b> plásmido <i>reporter</i> que contiene el gen testigo de la luciferasa (pGL3basic) fusionado con el promotor del gen COX-2 (-1796, +104).</p> <p><b>p-COX-2-luc (P2-192):</b> plásmido <i>reporter</i> que contiene el gen testigo de la luciferasa (pGL3basic) fusionado con una región del promotor de COX-2 (-88, +104) que no contiene el sitio putativo de unión a NF-κB. Cedido por el doctor Miguel Ángel Íñiguez [94].</p>   |

Tabla 3: Listado de plásmidos empleados.

### 1.3. OLIGONUCLEÓTIDOS

#### Oligonucleótidos para qRT-PCR:

| Gen         | Secuencia                          | Tamaño amplicón | Posición nucleótidos |
|-------------|------------------------------------|-----------------|----------------------|
| COX-2       | 5'-CGCAGTACAGAAAGTATCACAGGC-3'     | 82 pb           | 1381/1462            |
|             | 5'-GCGTTTGCGGTACTCATTAAAA-3'       |                 |                      |
| GAPDH       | 5'-ACACTGCATGCCATCACTGCC-3'        | 266 pb          | 717/982              |
|             | 5'-GCCTGCTTCACCACCTTCTTG-3'        |                 |                      |
| AURKB       | 5'-GGGCGTCCTCTGCCCAAAGGC-3'        | 152 pb          | 360/511              |
|             | 5'-GCCTGGATTTCGATCTCTC-3'          |                 |                      |
| 5'UTR (VHC) | 5'-TGAGGAACTACTGTCTTCACGCAGAAAG-3' | 300 pb          | 47/347               |
|             | 5'-TGCTCATGGTGCACGGTCTACGAG-3'     |                 |                      |

#### Oligonucleótidos para ChIP:

| Gen   | Secuencia                  | Tamaño amplicón | Posición nucleótidos |
|-------|----------------------------|-----------------|----------------------|
| COX-2 | 5'-ACTCGCCCCAGTCTGTCCCG-3' | 379 pb          | -1812/-2190          |
|       | 5'-GGGCAGGGTTTTTACCCAC-3'  |                 |                      |

#### Oligonucleótidos para pirosecuenciación:

| Gen         | Secuencia                       | Tamaño amplicón | Posición nucleótidos |
|-------------|---------------------------------|-----------------|----------------------|
| AURKB       | 5'-GGTGGACCTAAAGTTCCCGCTTC-3'   | 199 pb          | 5732/5934            |
|             | Bt-5'-CACGCACCCGAGTGAATGACAG-3' |                 |                      |
| AURKB 5'UTR | 5'-GGCGTGGCAGATTCAATTGTT-3'     | 241 pb          |                      |
|             | Bt-5'-AAGGGAGCAGGTCAGCACACT-3'  |                 |                      |

#### Oligonucleótidos para DNA genómico:

| Gen   | Secuencia                       | Tamaño amplicón | Posición nucleótidos |
|-------|---------------------------------|-----------------|----------------------|
| AURKB | 5'-GGTGGGCAGAGTGTATTTGC-3'      | 375 pb          | 5620/5994            |
|       | 5'-CAGATAAGGGAACAGTTAGGGATCC-3' |                 |                      |

#### Oligonucleótidos para clonaciones:

| Construcción                  | Secuencia                        | Tamaño amplicón |
|-------------------------------|----------------------------------|-----------------|
| pGEX-4T1-GST-AURKB (1-75)     | 5'-GAATTCATGGCCCAGAAGGAG-3'      | 249 pb          |
|                               | 5'-GCCGCTCGAGGTCATCAATTGTGAAG-3' |                 |
| pGEX-4T1-GST-AURKB (1-250)    | 5'-GAATTCATGGCCCAGAAGGAG-3'      | 774 pb          |
|                               | 5'-GCCGCTCGAGATTGTGCATGCGCCCC-3' |                 |
| pcDNA3.1His(A)-core1b (1-122) | 5'-GGGCTGGCAAGCCACGTTTGGTG-3'    | 382 pb          |
|                               | 5'-GGCTGCGGCCGCGACCTTACC-3'      |                 |

#### Oligonucleótidos para mutagénesis dirigida:

| Construcción               | Secuencia                        | Posición nucleótidos |
|----------------------------|----------------------------------|----------------------|
| pGEX-4T1-GST-AURKB p.M298T | 5'-CGCTTCCTGTGCCACGGGAGCCCAGG-3' | 5750/5775            |

|                            |   |           |
|----------------------------|---|-----------|
|                            | 5'- CCTGGGCTCCC <u>G</u> TGGGCAC <u>G</u> GAAGCG-3' |           |
| pGEX-4T1-GST-AURKB wt      | 5'-CGCTTC <u>C</u> GTGCCCATGGGAGCCCAGG-3'           | 5750/5775 |
|                            | 5'-CCTGGGCTCCC <u>A</u> TGGGCAC <u>G</u> GAAGCG-3'  |           |
| pGEX-4T1-GST-AURKB c.1007p | 5'-CGCTTC <u>T</u> GTGCCCATGGGAGCCCAGG-3'           | 5750/5775 |
|                            | 5'-CCTGGGCTCCC <u>A</u> TGGGCAC <u>A</u> GAAGCG-3'  |           |

Sondas:

| Sonda | Gen   | Tipo           | Secuencia                             | Tamaño amplicón | Posición nucleótidos |
|-------|-------|----------------|---------------------------------------|-----------------|----------------------|
| FRET  | AURKB | Primer directo | 5'-GGTGGACCTAAAGTTCCCCGCTTC-3'        | 95 pb           | 5732/5826            |
|       |       | Primer reverso | 5'-CCAGGGGCAGCCGTTCG-3'               |                 |                      |
|       |       | FAM            | 5'-CCACGGGAGCCAGGA-3'-FAM             |                 | 5760-5776            |
|       |       | Cy5            | Cy5-5'-TCATCTCCAACTGCTCAGGCATAACCC-3' |                 | 5779-5806            |

Tabla 4: Listado de oligonucleótidos empleados para qRT-PCR, ChIP, pirosecuenciación, amplificación de DNA genómico, clonaciones, mutagénesis dirigida, sondas FRET y sondas LNA.

## 1.4. LÍNEAS CELULARES

### 1.4.1. CÉLULAS HuH7.5

La línea celular HuH7.5 fue generada en el laboratorio del Dr. Reeves. Esta línea celular se ha autenticado en el servicio de genómica del Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (CBMSO). Es una línea celular de hepatoma humano

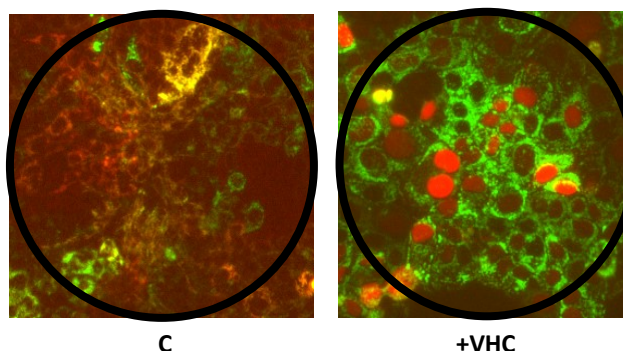


Figura 13. Células HuH7.5 reporter infectadas y sin infectar por el VHC.

derivada de las células HuH7, establecidas por Nakabayshi y Sato en 1982; con una mayor permisividad a la infección y replicación del VHC (Blight et al., 2002), con capacidad de replicación autónoma, genoma dicistrónico y con la posibilidad de seleccionar aquellas que posean RNA procedente del virus derivado del genotipo 2a JFH1. Estas células han sido modificadas genéticamente con la finalidad de permitir la observación de infecciones *in vivo* o en células fijadas, dando lugar a las células HuH7.5 *reporter* (Jones et al., 2010). Estas células han sido transducidas de manera estable con lentivirus, permitiendo la expresión de la proteína roja fluorescente (RFP) y la proteína verde fluorescente (GFP). La RFP se encuentra fusionada a una señal de localización nuclear y al IPS-1 (proteína estimuladora del promotor de interferón beta 1), un conocido sustrato de la proteasa

NS3-4A, que se encuentra anclado a la mitocondria. En ausencia de una infección productiva la RFP permanece unida a la mitocondria, observándose una fluorescencia citoplasmática. Sin embargo, cuando se produce una infección productiva por el VHC, se corta el IPS-1 por la proteasa viral NS3-4A permitiendo la translocación de RFP al interior del núcleo que adquiere color rojo (*Figura 13*).

#### **1.4.2. HEPATOCITOS PRIMARIOS**

Los hepatocitos primarios humanos fueron proporcionados por el doctor Jordi Muntané. Fueron preparados a partir de las biopsias de hígado de dos pacientes que habían sido sometidos a una resección quirúrgica de tumores hepáticos de origen no viral, con el consentimiento escrito firmado por los pacientes. Los hepatocitos fueron aislados mediante el procedimiento de perfusión con colagenasa de dos etapas [95].

#### **1.5. CEPA INFECCIOSA DE VHC**

El virus inicial VHC-p0 fue obtenido tras electroporar células Lunet con RNA transcrito de Jc1FLAG2 (p7-nsGluc2A), una quimera de las cepas cultivables de VHC J6 y JHF-1 del genotipo 2a [96]. Con la finalidad de estudiar la evolución a largo plazo, el virus VHC-p0 fue sometido a 200 pases seriados en células HuH7.5 reporter, con células *naïve* infectadas en cada pase. En este trabajo se han utilizado los virus VHC-p0, VHC-p100 y VHC-p200, teniendo este último un *fitness* 2.2 veces mayor que el primero [12]. Todos los experimentos con cepas virales fueron realizados en colaboración con el laboratorio del Dr. Esteban Domingo y la Dra. Celia Perales.

## **2. ESTUDIO *IN VITRO***

### **2.1. CULTIVOS CELULARES**

Las células HuH7.5 reporter se cultivaron en medio DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) pH 7,35 (Gibco®, Waltham, Massachusetts, EEUU) suplementado con 1% de glutamina y con 10% de suero fetal bovino (Blight *et al.*, 2002), 100 U/ml de penicilina G y 100 µg/ml de estreptomycin. Todas las células fueron cultivadas a la temperatura de 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> y 95% de humedad.

#### **2.1.1. INFECCIÓN VIRAL**

La infección viral se llevó a cabo 24 horas después de sembrar las células a una densidad de  $2 \cdot 10^5$  células/pocillo en placas MW6 o  $5 \cdot 10^4$  células/pocillo en placas MW24 utilizando una multiplicidad de infección (MOI) de 0.03 (TCID<sub>50</sub>/célula). Las células

infectadas fueron incubadas durante 5 horas, seguidamente fue retirado el medio que contenía el inóculo, y se añadió medio DMEM suplementado con 10% de suero.

Como control negativo de infección se usó el virus GNN, ya que al portar una mutación en la polimerasa viral NS5A que conlleva defectos en la replicación, no se obtienen partículas infecciosas.

### **2.1.2. TRANSFECCIONES**

Las placas para cultivos celulares se obtuvieron de Falcon (Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, NJ, EEUU). Para los experimentos, las células se sembraron en placas multiwell de 6 y 24 pocillos a una confluencia de  $2 \cdot 10^5$  y  $5 \cdot 10^4$  células/pocillo respectivamente. Tras 24 horas, las células se transfectaron usando el reactivo FuGeneHD (Promega, Fitchburg, Wisconsin, EEUU) siguiendo las instrucciones del proveedor. Se transfectaron 0.25 y 1  $\mu$ g de los vectores de expresión pCMV-HA-0, pCMV-HA-core o pCMV-NS5A de los diferentes genotipos en placas MW24 y MW6, respectivamente. Adicionalmente se sobreexpresó entre 1-5 veces más de los diferentes vectores de expresión de la AURKB en los experimentos indicados.

En los experimentos de Coimmunoprecipitación e Inmunoprecipitación de cromatina, se emplearon placas P100, sembradas a una confluencia de  $10^6$  células/placa y se transfectaron 8  $\mu$ g de los vectores de expresión por placa mediante el método de fosfato cálcico: mezcla de DNA con 250 mM  $\text{CaCl}_2$  en relación 1:1 con el tampón HBS 2X (50 mM HEPES pH 7.07, 10 mM KCl, 12 mM dextrose, 280 mM NaCl, 1.5 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  pH 7.1), se mezclaron lentamente por goteo y fueron añadidas a las células e incubadas durante 16 horas para seguidamente lavar dos veces consecutivas con PBS y añadir medio DMEM suplementado con un 10% de suero.

### **2.1.3. ENSAYOS DE RNA DE INTERFERENCIA**

Cincuenta o 100 nM de los siRNAs de AURKB (Dharmacon, Lafayette, CO, EEUU) fueron transfectados empleando el reactivo FuGeneHD (Promega). 72 horas después de la transfección se recogieron las células. Las cantidades de mRNA y los niveles de proteína de la AURKB fueron determinados por qRT-PCR y western blot respectivamente.

### **2.1.4. TRATAMIENTOS FARMACOLÓGICOS**

- ZM-447439 (Tocris, Bio-Techne, Minneapolis, Minnesota, EEUU): inhibidor de la AURKB. Añadido 30 minutos después de la transfección a una concentración final de 2  $\mu$ M. Los extractos se recogieron 72 horas después de la adición del tratamiento.
- Ácido okadaico (Sigma): inhibidor de las fosfatasa PP1 y PP2A.



Añadido 3.5 horas después de la transfección a una concentración final de 2 nM. Los extractos se recogieron 72 horas después de la adición del tratamiento.

- AZD1152-HQPA (Sigma): inhibidor de la AURKB.

Añadido 30 minutos después de la transfección a una concentración final de 25 nM. Los extractos se recogieron 72 horas después de la adición del tratamiento.

- Antivirales de acción directa

Los antivirales utilizados fueron un inhibidor de la polimerasa viral, sofosbuvir (SOF) (C22H29N3FO9P) (Selleck Chemicals, Houston, EEUU), y un inhibidor de la NS5A, daclatasvir (DCV) (C40H50N8O6) (Selleck Chemicals).

Añadidos 72 horas después de la infección a unas concentraciones finales de 4.000 nM de DCV y 20.000 nM de SOF. Los extractos se recogieron a tiempos 0, 24, 48 y 72 horas después de la adición de los mismos.

## **2.2. DETERMINACIÓN DE LOS PARÁMETROS VIRALES**

La determinación de los parámetros virales fue llevada a por el grupo del doctor Esteban Domingo según los procedimientos descritos en [12].

### **2.2.1. TITULACIÓN VIRAL**

Para la titulación viral, se hicieron diluciones seriadas a partir de los sobrenadantes procedentes de las diferentes muestras, que se utilizaron para infectar una nueva monocapa de células HuH7.5 sembradas 16 horas antes a una confluencia de 6400 células/pocillo en placas MW96. 72 horas después de la infección, las células se lavaron con PBS, se fijaron con metanol frío y fueron incubadas con el anticuerpo monoclonal contra NS5A como está descrito previamente [9]. Los títulos virales se expresaron como dosis infecciosa (TCID<sub>50</sub>/ml). La titulación de cada sobrenadante se llevó a cabo por triplicado.

### **2.2.2. DETERMINACIÓN DEL RNA VIRAL**

La cuantificación del RNA viral se llevó a cabo mediante qRT-PCR a partir del RNA total extraído de las células utilizando Light Cycler RNA Master SYBR green I kit (Roche). Se amplificó la región 5'UTR (región 5' no traducida) del genoma del VHC utilizando los primers VHC-5UTR-F2 y VHC-5UTR-R2 (*Tabla 3 – Oligonucleótidos para qRT-PCR*). La cuantificación fue relativizada a una curva standard con concentraciones conocidas del RNA viral. La especificidad de la reacción se determinó mediante una curva de desnaturalización del DNA amplificado. Los controles negativos (sin molde de RNA o con

el RNA de células sin infectar) fueron analizados en paralelo para cada reacción de amplificación para garantizar la ausencia de contaminaciones. Las cuantificaciones fueron realizadas por triplicado.

### **2.3. DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS**

#### **2.3.1. EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES**

72 horas después de la transfección o de la infección viral, las células fueron lavadas con buffer PBS 2 veces consecutivas; seguidamente se prepararon lisados celulares utilizando el buffer de lisis (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150mM NaCl, 0,5% SDS, 30 mM PPI, 125 mM NaF; 100μM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> junto con un cóctel de inhibidores de proteasas), las muestras se jeringuearon 10-14 veces y se incubaron durante 10 minutos en hielo. Seguidamente se centrifugaron a 13.000 rpm durante 15 minutos a 4°C. Se recogieron los sobrenadantes resultantes, donde se encontraba la fracción proteica y se utilizaron para cuantificar la proteína. La concentración de proteína fue determinada mediante el uso de Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Fischer Scientific), utilizando albúmina sérica bovina (BSA) para la curva standard.

#### **2.3.2. ENSAYO DE WESTERN BLOT**

Entre 15-50 μg de los extractos proteicos totales fueron sometidos a electroforesis en condiciones desnaturalizantes en geles SDS-PAGE al 10-15% y transferidos a membranas de nitrocelulosa Whatman-Protran con un tamaño de poro de 0.2 μm (Sigma) durante 1 hora a 120V. Posteriormente, la membrana se bloqueó durante 1 hora con una solución de TBS (tampón salino de Tris) y 0.1% de Tween-20 (Thermo Fischer Scientific) con leche desnatada al 5% para luego ser incubada con los diferentes anticuerpos primarios disueltos en BSA al 4% en TTBS toda la noche a 4°C. Seguidamente, se incubó con el anticuerpo secundario y se revelará detectando la fluorescencia con Odyssey CLX Imaging System (Li-Cor, Lincoln, Nebraska, EEUU) o mediante ECL Western Blotting Systems GE Healthcare (Chicago, Illinois, EEUU).

#### **2.3.3. COINMUNOPRECIPITACIÓN (CoIP)**

Se utilizaron 1 millón de células HuH7.5 en 8 placas p100 que se transfectaron con los vectores de expresión de core (pCMV-HA-core) mediante transfección con fosfato cálcico. 72 horas después de la transfección, las células fueron recogidas en buffer de CoIP (50 mM HEPES pH 7.5, 0.6 M KCl, 0,5% NP40, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 1 μM DTT, 1 mM PMSF e inhibidores de proteasas). La cantidad de proteína fue determinada mediante el método

de Bradford Protein Assay (Bio-Rad, Hercules, CA, EEUU). 1mg de proteína se incubó durante toda la noche con anticuerpo específico para la proteína de interés o con Normal Rabbit IgG (Santa Cruz Biotechnology) para descartar uniones inespecíficas. Posteriormente, se añadieron 40  $\mu$ l de proteína A (Protein A beads). Finalmente, se lavaron los inmunoprecipitados y se analizaron por Western blot utilizando el anticuerpo específico para la segunda proteína de interés.

#### **2.3.4. PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS GST**

Bacterias competentes BL21 fueron transformadas con los plásmidos de expresión bacteriana pGEX4T correspondientes, y crecidas a 37°C hasta alcanzar una DO ( $\lambda=600$  nm) = 0.6-0.8. A continuación, la expresión de las proteínas de fusión fue inducida con 0.4 mM IPTG (Sigma) a 30°C durante 1 hora. Seguidamente, se centrifugaron las bacterias y se lisaron con un buffer de lisis que contenía PBS frío, 0.6 mM PMSF, inhibidores de proteasas y 1% de Tritón. Los extractos se sonicaron en hielo 6 ciclos de 15"ON/15"OFF. Se centrifugó 10 minutos a 13000 rpm y el sobrenadante se incubó con 150  $\mu$ l Sepharosa al 50% durante 1 hora a 4°C. Posteriormente se realizaron 3 lavados con PBS y se resuspendió la proteína de fusión GST en 75  $\mu$ l de PBS. La concentración de proteína obtenida se determinó mediante electroforesis en un gel SDS-PAGE y tinción con azul brillante de Coomassie R-250 (Bio-Rad), utilizando distintas concentraciones de BSA como referencia.

#### **2.3.5. ENSAYO DE INTERACCIÓN PROTEÍNA-PROTEÍNA *IN VITRO* O *PULL DOWN***

La proteína core 1b o, alternativamente, core 1b (1-122), se tradujo *in vitro* mediante la adición de 2  $\mu$ g de su vector de expresión pcDNA3.1His(A)-core1b a 30  $\mu$ l de lisado de reticulocitos TnT® Quick Coupled Transcription/Translation System (Promega), siguiendo las instrucciones del proveedor y en presencia de 16.5  $\mu$ Ci de <sup>35</sup>S-metionina durante 1.5h a 30°C. El producto se resolvió por SDS-PAGE y se visualizó mediante autoradiografía. 5  $\mu$ l de la proteína traducida se utilizaron en la interacción con 1  $\mu$ g de las proteínas GSTs. Cada mezcla se incubó en 150  $\mu$ l de buffer IPAB (20 mM HEPES pH 7.5, 150 mM KCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,02% Tritón, 0,02  $\mu$ g/ $\mu$ l BSA, 1 mM PMSF e inhibidores de proteasas) durante una hora a 4°C. Seguidamente se realizaron 3 lavados con el buffer IPAB y se resuspendió en 20  $\mu$ l de buffer de carga de proteínas. El producto se resolvió por electroforesis SDS-PAGE y se visualizó mediante autorradiografía con Agfa® X-Ray Film (VWR, RDNAor, PA, EEUU).

#### **2.3.6. ENSAYO QUINASA**

Se utilizaron 500 ng de las diferentes construcciones de GST-AURKB y 2.5 µg histona H3 como sustrato por reacción. Las reacciones se llevaron a cabo en 30 µl de buffer quinasas (250 mM HEPES pH 7.5, 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM β-Glicerofosfato, 5 mM DTT, 12.5 mM EGTA, 0.5 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 5 µM NaF) conteniendo 150 µM ATP frío y 5 µCi de <sup>32</sup>P-ATP, y se incubaron a 30°C durante 20 minutos, agitando cada 5 minutos. El producto se resolvió por SDS-PAGE y se visualizó mediante autoradiografía con Agfa® X-Ray Film (VWR).

## **2.4. DETERMINACIÓN DE RNA**

### **2.4.1. EXTRACCIÓN DE RNA**

Previamente a la extracción de RNA, las células se lavaron con PBS a 4°C y el RNA se extrajo utilizando TRI Reagent® (Sigma) según las indicaciones del proveedor. La cantidad de RNA y su pureza se determinaron midiendo la absorbancia a 260 y 280 nm mediante el uso de un espectrofotómetro de espectro total Nanodrop.

### **2.4.2. RT-PCR**

Para cada una de las muestras se emplearon 2 µg de RNA que fueron retro-transcritos a cDNA mediante el uso del kit AMV Reverse Transcriptase (Promega) y de random primers en un volumen final de 20 µl siguiendo los siguientes ciclos en el termociclador: 10 minutos a 25°C, 30 minutos a 40°C, 30 minutos a 48°C y 2 minutos a 80°C.

### **2.4.3. qRT-PCR**

Se utilizaron 2 µl del cDNA obtenido en la reacción de RT-PCR para cada una de las reacciones de QRT-PCR. Empleando la mezcla de reacción de FastStart Universal SYBR Green Master (ROX) de Roche en un volumen final de 20 µl y siguiendo las instrucciones del proveedor. Mediante el uso de un termociclador Real Time PCR Cycler Rotor Gene 2000 (Qiagen) se realizaron los siguientes ciclos: 10 minutos a 95°C para desnaturalizar el cDNA, a continuación 40 ciclos de 15 segundos a 95°C, 15 segundos a 55-65°C (en función de los primers) y 30 segundos a 72°C, adquiriéndose la fluorescencia a 80-85°C durante 15 segundos; finalmente 10 minutos a 72°C. La expresión relativa de cada gen se calculó utilizando el método de 2-ΔΔCt [97]. Los niveles de expresión de cada producto de PCR se calcularon como la abundancia relativa de RNA con respecto a la muestra control y se relativizaron con respecto a la expresión de la GAPDH.

### **2.4.4. RNA-Seq**

Las muestras de RNA total fueron procesadas mediante el NEBNext® Ultra™ Directional RNA Library Prep kit (Illumina, San Diego, CA, EEUU) de acuerdo con las instrucciones del proveedor. Las librerías de RNA fueron secuenciadas en el secuenciador Illumina Hiseq 2000 sequencer generando ~90 millones pares de lecturas por muestra. Se determinó la calidad de las lecturas mediante un análisis usando FASTQC y los resultados fueron alineados con el HG19 Human Genome usando TopHat. El número de fragmentos por millón de kilobases (FPKM) para cada gen se determinó usando Cufflinks. Los resultados procedentes del empleo de esta técnica nos permitieron determinar los 11358 genes que se expresan en las células HuH7.5.

## **2.5. MEDIDA DE LA ACTIVIDAD TRANSCRIPCIONAL. ENSAYO DE LUCIFERASA**

Las células fueron sembradas en placas MW24, tras la infección con el VHC o la transfección con los cDNAs de las diferentes proteínas, fueron co-transfectadas con FuGeneHD (Promega) con 0.0625 µg de un plásmido *reporter* con el promotor del gen de interés unido a la secuencia codificante de la luciferasa junto con 0.0025 µg el vector pRL-TK, que contiene el gen de la proteína renilla y que se utilizó como control interno de transfección. 72 horas después de la transfección las células se lisaron con Passive Lysis Buffer y se determinó la actividad luciferasa y renilla empleando el kit Dual-Luciferase® Reporter Assay System (Promega). La actividad de la luciferasa se normalizó con la actividad renilla y la cantidad de proteína, previamente cuantificada mediante el método de Bradford Protein Assay (Bio-Rad, Hercules, CA, EEUU), siguiendo las instrucciones del proveedor.

## **2.6. ENSAYO DE INMUNOPRECIPITACIÓN DE CROMATINA (ChIP)**

72 horas después de la infección o, alternativamente, de la transfección con fosfato cálcico de los vectores de expresión pCMV-0 o pCMV-core 2a; las células fueron disgregadas con Tripsina y resuspendidas en medio a una confluencia final de  $5 \cdot 10^6$  células/ml. Los complejos DNA/proteína se cross-linkaron con buffer formaldehído al 1% (0.1 M NaCl, 1 mM EDTA pH 8, 0.5 mM EGTA pH 8, 20 mM HEPES pH 8, 11% HCHO) durante 10 min a 37°C, parando la reacción con Glicina 125 mM (concentración final). Seguidamente se lavaron con PBS, y dos lavados sucesivos con los buffers B (0.25% Tritón, 10 mM EDTA pH 8, 0.5 mM EGTA pH 8, 20 mM HEPES pH 8) y C (0.15 M NaCl, 1 mM EDTA pH 8, 0.5 mM EGTA pH 8, 20 mM HEPES pH 8) y se resuspendieron en el buffer de incubación IB (0.15% SDS, 1% Tritón, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA pH 8, 0.5 mM EGTA pH 8, 20 mM HEPES pH 8). A continuación, se sonicaron mediante el uso de un sonicador Bioruptor UCD-200TM (Diagenode, Liège, Belgium) con ciclos

de 30"ON/30"OFF durante 12.5 minutos.  $2.5 \cdot 10^6$  células por reacción se resuspendieron en un volumen final de 300  $\mu$ l de IB con 30  $\mu$ l de proteína sepharosa A/G, 0.1 % BSA, 3  $\mu$ g del anticuerpo e inhibidores de proteasas. Se incubaron toda la noche a 4°C para seguidamente someterlas a sucesivos lavados: 2X buffer 1 (0.1% SDS, 0.1% DOC, 1% Tritón, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA pH 8, 0.5 mM EGTA pH 8, 20 mM HEPES pH 8), 1X buffer 2 (0.1% SDS, 0.1% DOC, 1% Tritón, 500 mM NaCl, 1 mM EDTA pH 8, 0.5 mM EGTA pH 8, 20 mM HEPES pH 8), 1X buffer 3 (0.25 M LiCl, 0.5% DOC, 0.5% IgePal, 1 mM EDTA pH 8, 0.5 mM EGTA pH 8, 20 mM HEPES pH 8), 2X buffer 4 (1 mM EDTA pH 8, 0.5 mM EGTA pH 8, 20 mM HEPES pH 8). A continuación, se eluyó la cromatina con buffer de elución (1% SDS, 0.1 M  $\text{NaHCO}_3$ ) y se procedió a descrosslinkarla con 200 mM de NaCl a 65°C durante toda la noche y posteriormente 1 hora a 50°C en presencia de la Proteinasa K. Finalmente, el DNA se purificó con QIAquick Kit (Qiagen) y se analizó por qRT-PCR. Los primers utilizados están descritos en la tabla 3 – Oligonucleótidos para ChIP. Los valores de Ct de las secuencias de interés fueron normalizados en relación con los inputs mediante el uso de la siguiente ecuación:  $2^{-[\text{Ct}(\text{Inmunoprecipitado}) - \text{Ct}(\text{input})]}$ .

### **2.7. ENSAYO DE PROLIFERACIÓN**

Se sembraron placas MW24 a una confluencia de 20.000 células por pocillo. Las células fueron infectadas con el VHC y/o transfectadas con los plásmidos de expresión de diferentes proteínas. A los tiempos indicados para cada ensayo de proliferación (24-144 horas), las células fueron separadas con Tripsina-EDTA y contadas empleando una cámara de Neubauer (Marienfeld Superior, Lauda-Königshofen, Germany) y usando una solución de Trypan Blue Stain 0.4% (Sigma)/PBS (1:1) para descartar las células muertas. Se utilizaron triplicados de cada muestra.

### **2.8. ENSAYOS DE VIABILIDAD CELULAR**

Se sembraron placas MW24 a una confluencia de 20.000 células por pocillo. Las células fueron infectadas con el VHC y/o transfectadas con los plásmidos de expresión de diferentes proteínas. A los tiempos indicados para cada ensayo de viabilidad (24-144 horas), las células se incubaron con MTT (3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium Bromide, Thiazole Blue) (Calbiochem) a una concentración final de 0.2 mg/ml a 37°C durante 3 horas; seguidamente, se lavaron con PBS y se añadió 1 ml de DMSO (Merk Millipore), incubando la placa en agitación durante 10 minutos. Finalmente se midió la absorbancia a 630 nm y 570 nm en el espectrofotómetro. Se utilizaron triplicados de cada muestra.

## **2.9. INMUNOFLUORESCENCIA**

72 horas después de la infección con el VHC o de la transfección, las células HuH7.5 fueron lavadas con PBS, fijadas con paraformaldehído al 4% en PBS durante 10 minutos a temperatura ambiente, lavadas 2-3 veces con PBS y permeabilizadas con tritón 0.1% en PBS 15 minutos a temperatura ambiente. Seguidamente fueron lavadas con PBS e incubadas con Glicina 0.1 M en PBS durante 5 minutos a temperatura ambiente, a continuación se lavaron con PBS dos veces sucesivas y fueron incubadas con los anticuerpos primarios contra AURKB, H3Ser10ph y  $\alpha$ -tubulina durante 1 hora a 37°C y posteriormente se lavaron 3 veces con PBS y se incubaron con los anticuerpos secundarios goat-anti rabbit Alexa-Fluor 546 para los dos primeros y goat-anti mouse Alexa-Fluor 488 para el último 1 hora a 37°C en oscuridad. Se lavaron con PBS y se marcaron los núcleos con DAPI (10  $\mu$ g/ml en PBS) durante 5 minutos en oscuridad. Las imágenes fueron adquiridas con microscopía confocal Axiophot (Zeiss, Oberkochen, Germany) con un objetivo Plan-NEOFLUAR 20x y procesadas utilizando el software ZEN 2011 (Zeiss) y Adobe Photoshop CS.

## **2.10. ANÁLISIS *IN SILICO* DE LOS SNPS**

En cuanto a la evaluación funcional de las variantes genéticas, especialmente en aquellos polimorfismos que no implican una variación en la secuencia primaria de la proteína, determinamos su efecto en el contexto de motivos de DNA reconocidos por las diferentes proteínas. Para ello, se llevó a cabo un análisis *in silico* usando el software PROMO, en el servidor web ALGGENE [86, 98, 99]. La búsqueda de posibles factores de transcripción se llevó a cabo usando los siguientes parámetros: especie humana, todos los motivos y todos los factores. Todas las secuencias génicas en formato FASTA para el análisis *in silico* de los polimorfismos estudiados se obtuvieron de la base de datos Ensembl release 87 (<http://www.ensembl.org>).

## **2.11. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Los resultados se expresaron como las medias  $\pm$  la desviación estándar representada por las barras de error. Las comparaciones se hicieron utilizando la prueba *t de Student* para testar las diferencias entre el control y las muestras, y esas diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando  $p < 0.05$  (\*),  $p < 0.01$  (\*\*) o  $p < 0.001$  (\*\*\*)

## **3. ESTUDIO *IN VIVO***

### **3.1. DISEÑO Y ÁMBITO DEL ESTUDIO**

El trabajo se diseñó como un estudio observacional, retrospectivo en el que se incluyeron un total de 348 pacientes con hepatitis crónica C que fueron atendidos en el Hospital Universitario La Paz entre los años 2014-2015.

### **3.2. CRITERIOS DE SELECCIÓN DE PACIENTES**

**Criterios de inclusión:** pacientes con hepatitis crónica C de los que se disponía de al menos una prueba de evaluación del grado de fibrosis hepática durante su seguimiento o con posibilidad de realizar dicha prueba de forma prospectiva durante el desarrollo de la tesis. Para poder evaluar la velocidad de progresión de la fibrosis en los pacientes incluidos se seleccionaron aquellos de los que se disponía de un tiempo conocido de portador crónico de la infección por VHC superior a 20 años. Con respecto a los pacientes que habían recibido tratamiento antiviral, se incluyeron pacientes no respondedores a la terapia o pacientes respondedores a tratamiento, considerándose en este caso como última muestra elegible para el estudio, la muestra basal de dicho tratamiento.

También era necesaria la disponibilidad de muestras prospectivas o retrospectivas de sangre total y/o de la fracción de células monocnucleares de sangre periférica (CMSPs) para el análisis de los SNPs de las actividades enzimáticas implicadas en los procesos de regulación epigenética inducidos por el VHC.

**Criterios de exclusión:** Se excluyeron aquellos pacientes coinfectados por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), el virus de la hepatitis B (VHB) o que presentaban otras causas de hepatopatía como hepatitis autoinmune, alcohólica o enfermedades metabólicas.

### **3.3. PERIODO DE RECOGIDA DE DATOS**

Se recogieron de forma retrospectiva y longitudinal todos los datos clínicos y virológicos de los pacientes durante todo el periodo conocido de infección por VHC, a partir de los registros de las historias clínicas.

El análisis de composición alélica de los pacientes se hizo de forma transversal sobre una única muestra de sangre total o CMSPs, recogida de forma retrospectiva o prospectiva, dependiendo de su disponibilidad al comienzo del estudio.

### **3.4. VARIABLES DE ESTUDIO**

#### **3.4.1. CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS**



Se recogieron datos demográficos de todos los pacientes, que incluían año de nacimiento, sexo, grupo étnico y antecedentes personales de interés (hábitos tóxicos y comorbilidades importantes).

### **3.4.2. VARIABLES EPIDEMIOLÓGICAS**

Entre las variables epidemiológicas más importantes, se recogieron datos de:

- Posible ruta de infección por VHC (post-transfusional, adicción a drogas parenterales, otras vías parenterales, sexual, familiar o desconocida).
- Tiempo estimado de portador (periodo transcurrido desde la fecha estimada de infección),
- Tiempo conocido de portador (periodo transcurrido desde que se diagnosticó la infección por VHC).

### **3.4.3. DATOS VIROLÓGICOS**

En relación con los datos virológicos de infección por VHC se recogieron los siguientes parámetros:

- Genotipo del VHC. Los genotipos del VHC se determinaron de forma rutinaria en el hospital mediante el sistema *RealTime VHC Genotype II* (Abbott Molecular, des Moines, IL, USA), que permite la identificación de los 6 grandes tipos de VHC (genotipos 1-6) y permite además subtipar la mayoría de los pacientes con genotipo 1 en los subtipos 1a y 1b.
- Carga viral. Los niveles de VHC-RNA se determinaron de forma rutinaria en el hospital mediante los sistemas COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan VHC Test (Roche Molecular systems, Pleasanton, CA, USA) o el m2000SP/m2000 RT (Abbott Molecular) con un rango dinámico de entre 15 -  $6,9 \times 10^7$  IU/ml.

### **3.4.4. VARIABLES CLÍNICAS**

- Grado de fibrosis hepática. En la mayoría de los casos el nivel de fibrosis hepática se determinó mediante elastografía hepática de transición (Fibroscan) realizado por profesionales del Servicio de Digestivo del Hospital Universitario La Paz. En algunos pacientes se disponía de datos histopatológicos procedentes de biopsia hepática. El grado de fibrosis se categorizó en 4 estadios (F0-F1, F2, F3 y F4) en base a los valores de rigidez hepática obtenida en el Fibroscan (medida en kPa durante la evolución de su enfermedad), o por los resultados de la biopsia hepática. El diagnóstico de cirrosis (categoría F4) se determinó por valores de rigidez hepática superiores a 14 KPa, por evidencias histopatológicas o por evidencia clínica de descompensación hepática.

- Siempre que fue posible se determinó el tiempo estimado en alcanzar el último estadio de fibrosis, definido como el periodo transcurrido desde la fecha estimada de infección hasta la fecha de diagnóstico de cirrosis, o en el caso de los pacientes no cirróticos la fecha del primer Fibroscan que determine la clasificación del paciente en el grado de fibrosis más elevado de su historial clínico.
- Los resultados del análisis alélico se analizaron en base al grado de desarrollo de fibrosis de los pacientes incluidos. Las comparaciones se realizaron siguiendo varios esquemas alternativos:
  - Comparación entre los diferentes grados de fibrosis entre sí.
  - Comparación entre pacientes con fibrosis moderada (grados F0-F2) vs fibrosis elevada (F3-F4).
  - Comparación entre pacientes cirróticos (F4) vs no cirróticos (F0-F3).
- Niveles de AST, ALT y FA, medidos en IU/ml
- Pruebas de imagen como ecografías abdominales, TAC y RMN, para diagnosticar complicaciones adicionales, como ascitis o carcinoma hepatocelular.
- Datos de tratamiento. Se recogieron los datos de tratamientos previos con interferón (IFN) y ribavirina (RBV), o de los tratamientos actuales con antivirales de acción directa (DAAs), incluyendo en todos los casos fechas de inicio y finalización del tratamiento, fármacos, pautas, nivel de respuesta y efectos secundarios. Se recogieron también los datos de polimorfismos de IL28B en el caso de los pacientes tratados con IFN+RBV.

### **3.5. ANÁLISIS EXPERIMENTAL DE POLIMORFISMOS GENÉTICOS**

La determinación de la composición alélica de las actividades enzimáticas celulares implicadas en la inducción de modificaciones epigenéticas mediadas por el VHC se realizó por amplificación génica de las regiones de interés y posterior análisis de los amplicones.

#### **3.5.1. EXTRACCIÓN DE DNA A PARTIR DE SANGRE TOTAL**

La extracción de DNA se realizó sobre muestras de sangre total o fracciones de CMSPs congeladas, utilizando dos sistemas alternativos de extracción. Para la extracción del DNA de muestras de CMSPs congeladas se empleó el kit comercial QIAmp DNA Blood (Qiagen, Venlo, Netherlands), siguiendo las instrucciones del fabricante. Para la extracción de DNA de muestras de sangre total se utilizó una técnica de digestión directa de volúmenes pequeños de sangre congelada, diluyéndola 1:13.33 en H<sub>2</sub>O, e incubándola 15 minutos a temperatura ambiente con agitación de vórtex cada 5 minutos.

Una vez extraído el DNA con cualquiera de las dos formas previamente descritas, este se almacenó a -20°C hasta su uso.

### **3.5.2. ANÁLISIS DE POLIMORFISMOS DE LA SECUENCIA CODIFICANTE DE LA AURKB**

El análisis de los polimorfismos se llevó a cabo mediante la técnica de secuenciación Sanger poblacional. Para confirmar la exactitud de la técnica de genotipado de alelos, 53 muestras se re-analizaron utilizando la técnica de Pirosecuenciación, y técnicas de amplificación/identificación alélica con sondas fluorescentes de tipo FRET.

#### **- PCR cualitativa y secuenciación Sanger**

Las reacciones de amplificación génica se realizaron utilizando PCR Master Mix (Promega, Fitchburg, Wisconsin, EEUU) siguiendo las instrucciones del fabricante con los primers de AURKB para DNA genómico. A continuación, se analizaron los productos de amplificación mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5% teñida con Gel Red Nucleic Acid (Biotium, EEUU) y se visualizaron con luz ultravioleta en un transiluminador Bio-rad Chemidoc 73s UV Transiluminador w/lens usando un control negativo con la mezcla de reacción y una muestra de extracción negativa para descartar posibles contaminaciones.

La secuenciación Sanger se llevó a cabo en el servicio del Instituto de Genética Médica y Molecular (INGEMM) del Hospital Universitario La Paz.

Las secuencias obtenidas fueron analizadas con el software DNASTAR Lasergene SeqMan Pro, versión 7.1.0 (DNASTAR, EEUU).

#### **- Pirosecuenciación**

Las muestras de DNA fueron amplificadas por PCR a tiempo final con los primers de la AURKB para pirosecuenciación biotinilados (*Tabla 3 – Oligonucleótidos para pirosecuenciación*) que flanqueaban las regiones de interés. A continuación, las muestras fueron purificadas empleando el GE Healthcare Purification Kit (Chicago, Illinois, EEUU) y siguiendo las instrucciones del fabricante para seguidamente secuenciar las muestras con el pirosecuenciador Qiagen's PyroMark Q96 con el modo para el análisis de SNPs, siguiendo el protocolo marcado por el proveedor.

#### **- q-PCR con sondas específicas**

Alternativamente, se diseñaron sondas FRET para determinar los alelos de la posición correspondiente al SNP rs1059476 mediante técnicas de PCR en tiempo real empleando LightCycler Multiplex DNA Master Mix (Roche) y el termociclador Lightcycler 2.0 con capilares. Se emplearon sondas FRET específicas, marcadas con los

fluoróforos FAM y Cy5 para amplificar y cuantificar el producto obtenido (*Tabla 3 – Sondas*). Las condiciones de la PCR fueron 95°C durante 10 minutos, 35 ciclos de 5 segundos a 95°C, 15 segundos a 57°C y 20 segundos a 72°C; y finalmente un ciclo de Melting donde la muestra se desnaturaliza durante 1 segundo a 99°C, luego se baja la temperatura a 37°C 1 segundo para que el DNA se religue y seguidamente se aumenta la temperatura 0.05°C/segundo. La adquisición se llevó a cabo en el canal de Cy5 (670 nm), excitando en el canal de FAM (495 nm).

### **3.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

El análisis estadístico se realizó utilizando el paquete informático IBM SPSS (Statistical Package for the Social Sciences), versión 23 (IBM Corporation, Somers, NY, USA). Todos los análisis estadísticos se realizaron con un nivel de significación del 0.05.

#### **3.6.1. ANÁLISIS DESCRIPTIVO**

La presentación de los valores de las diferentes variables del estudio se realizó utilizando los análisis estadísticos apropiados a su naturaleza:

- Variables continuas: se expresan como media y desviación estándar ( $m \pm SD$ ).
- Variables categóricas: se expresan en porcentaje con respecto al tamaño muestral total de cada categoría.

#### **3.6.2. ANÁLISIS INFERENCIAL**

Se han aplicado diferentes pruebas de hipótesis según la naturaleza de la variable. Para variables categóricas se utilizó la **prueba exacta de Fisher**, para las variables continuas la **t de student** y para las variables ordinales la **prueba U de Mann-Whitney**. Los p-valores fueron resultado de una prueba bilateral, considerándose estadísticamente significativo  $p \leq 0.05$ .

En el caso concreto del análisis de diferencias en la distribución de los distintos SNPs entre las categorías de pacientes (F0-F2 vs F3-F4 y F0-F3 vs F4) se evaluaron mediante la prueba de *chi-cuadrado*, con un intervalo de confianza del 95%. Las diferencias en la distribución de género y edad en las categorías de pacientes fueron determinadas empleando la prueba *chi-cuadrado* o la prueba de *U Mann-Whitney*.

### **3.7. CONSIDERACIONES ÉTICAS Y LEGALES**

Los estudios se realizaron de acuerdo con la Declaración de Helsinki de 1975 y con las leyes nacionales y locales. El comité de ética humana del Hospital Universitario La Paz,

Instituto de Salud Carlos III, aprobó los procedimientos del estudio. Todos los pacientes incluidos en el proyecto recibieron información sobre el mismo y tan solo participaron aquellos que firmaron un consentimiento escrito, con libertad para retirarse del estudio en el momento que desearan. Los datos clínicos y experimentales se han manejado garantizando la protección de datos personales, de acuerdo al Real Decreto RD 15/1999 de 13 de diciembre de 1999. Únicamente se utilizaron muestras clínicas sobre las que se hubieran completado las pruebas diagnósticas necesarias y, en ningún momento, se solicitaron muestras a los pacientes para su uso exclusivo en este proyecto. Las muestras utilizadas se almacenaron codificadas, previa autorización escrita de los pacientes, en la colección de muestras titulada “Investigación en hepatitis virales” inscrita con el código C.0000730 del Registro Nacional de Biobancos del Instituto de Salud Carlos III, de la que es titular el Dr. Javier García-Samaniego Rey, de acuerdo con la Real Decreto 1716/2011 de Biobancos.

---

# RESULTADOS

---

## **1. ANÁLISIS DE LA REGULACIÓN EPIGENÉTICA MEDIADA POR EL VIRUS DE LA HEPATITIS C**

### **1.1. ANÁLISIS DEL EFECTO DEL VHC EN LAS MODIFICACIONES POSTRADUCCIONALES DE LAS HISTONAS**

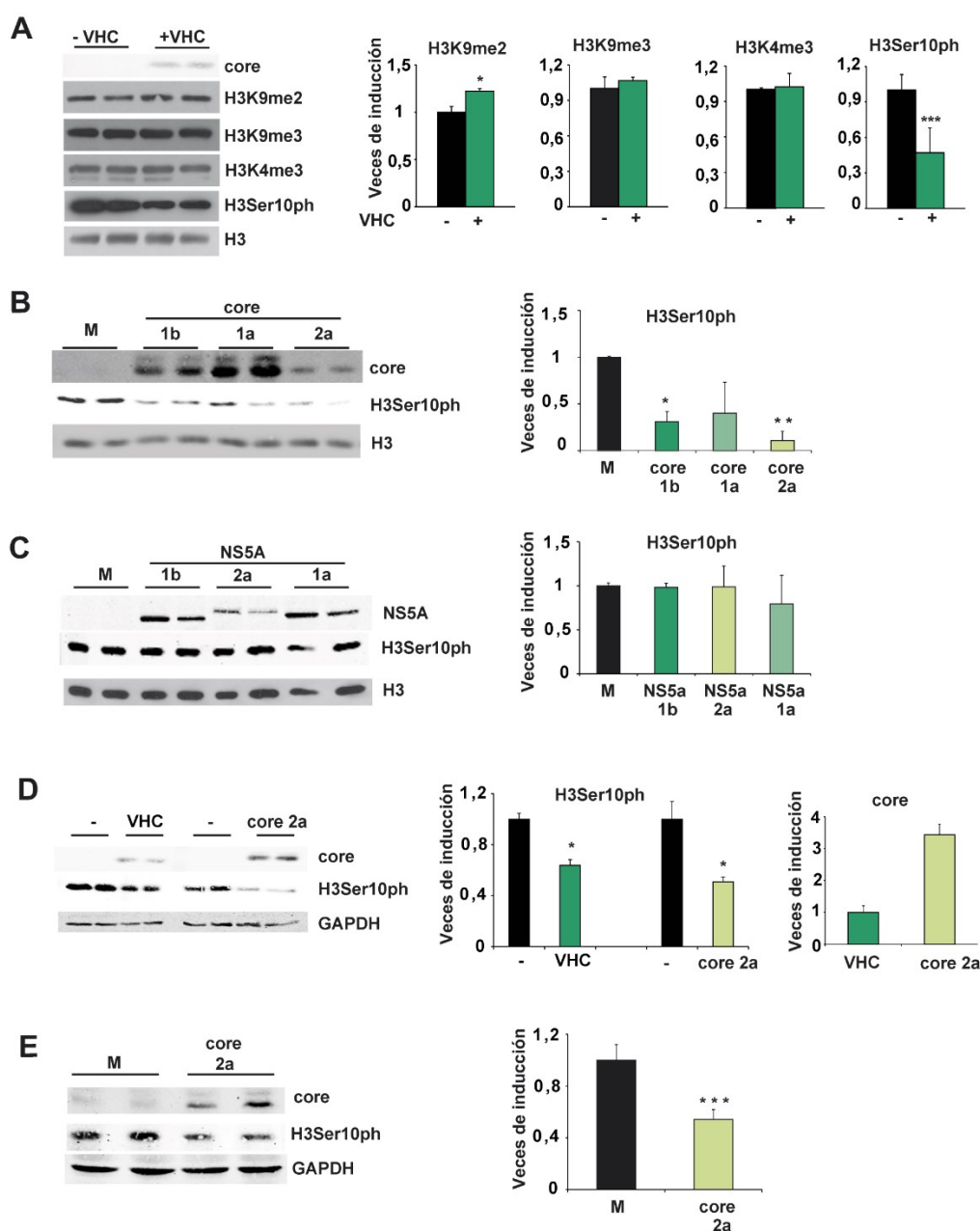
En primer lugar, se analizó el posible efecto de la infección por el virus de la hepatitis C a nivel epigenético en las células a las que infecta. Para estos ensayos utilizamos las células HuH7.5 *reporter*, que presentan una mayor permisividad a la infección y replicación del virus. El análisis de las modificaciones covalentes de histonas se llevó a cabo mediante ensayos de western blot a partir de células infectadas a una multiplicidad de infección de 0,03 TCID<sub>50</sub>/célula durante 72 horas. Se analizaron la di- y tri- metilación de la Lisina 9 en la histona H3 (H3Lys9me2 y H3Lys9me3), la trimetilación de la lisina 4 de la histona 3 (H3Lys4me3) y la fosforilación del residuo de serina 10 en la histona H3 (H3Ser10ph). La infección por el VHC produjo una marcada disminución, entre un 40 y un 60%, en los niveles globales de H3Ser10ph y un ligero aumento de H3Lys9me2; mientras que el resto de las marcas epigenéticas analizadas no mostraron ninguna alteración (*Figura 14 A*).

Con el fin de determinar que proteína viral era la responsable de la inhibición en la fosforilación de la histona H3, llevamos a cabo transfecciones transitorias en células HuH7.5 con los vectores de expresión pCMV-Core y pCMV-NS5a procedentes de los genotipos 1a, 1b y 2a. La expresión de la proteína core, al igual que la infección con el virus, provocó una disminución en los niveles globales de H3Ser10ph (*Figura 14 B*), mientras que la expresión de la proteína NS5A correspondiente a los mismos genotipos no produjo ningún efecto (*Figura 14 C*). El nivel de expresión de la proteína core de los diferentes genotipos fue diferente, sin embargo, todos ellos redujeron los niveles de H3Ser10ph, siendo esta disminución estadísticamente significativa tras la expresión de los genotipos 1b y 2a (*Figura 14 B*). Cabe destacar que no hay una correlación directa entre los niveles de expresión de core y la disminución de H3Ser10ph, hecho que sugiere la idea de que una baja expresión de core es suficiente para producir este efecto.

A continuación, comparamos los niveles de expresión de la proteína core en células infectadas con el VHC y en células transfectadas con el vector de expresión de core. Las células transfectadas con la proteína core del genotipo 2a mostraron unos niveles de expresión de la proteína core 3.4 veces mayor que las células infectadas con el VHC perteneciente al mismo genotipo. Sin embargo, a pesar de la menor expresión de core en las células infectadas, esta

fue suficiente para producir una reducción significativa en los niveles de H3Ser10ph (Figura 14 D). Esta observación coincide con el resultado observado en la figura 14 B.

Ya que las células HuH7.5 son células transformadas, quisimos analizar si en un sistema de cultivo primario de hepatocitos humano, la sobreexpresión de la proteína core también tenía la capacidad de regular la H3Ser10ph. Como se puede observar en la figura 14 E, la expresión transitoria de la proteína core provocó también una disminución significativa en los niveles totales de esta marca epigenética. El rango de disminución de los niveles de H3Ser10ph fue similar al observado en células transformadas tras la expresión de core.



**Figura 14. La infección por el VHC y la sobreexpresión de la proteína viral core disminuyen los niveles globales de H3Ser10ph.**

(A) Ensayo de western blot a partir de células HuH7.5 infectadas con VHC durante 72h. Los niveles globales de H3K9me2, H3K9me3, H3K4me3, H3Ser10ph y core se determinaron con anticuerpos



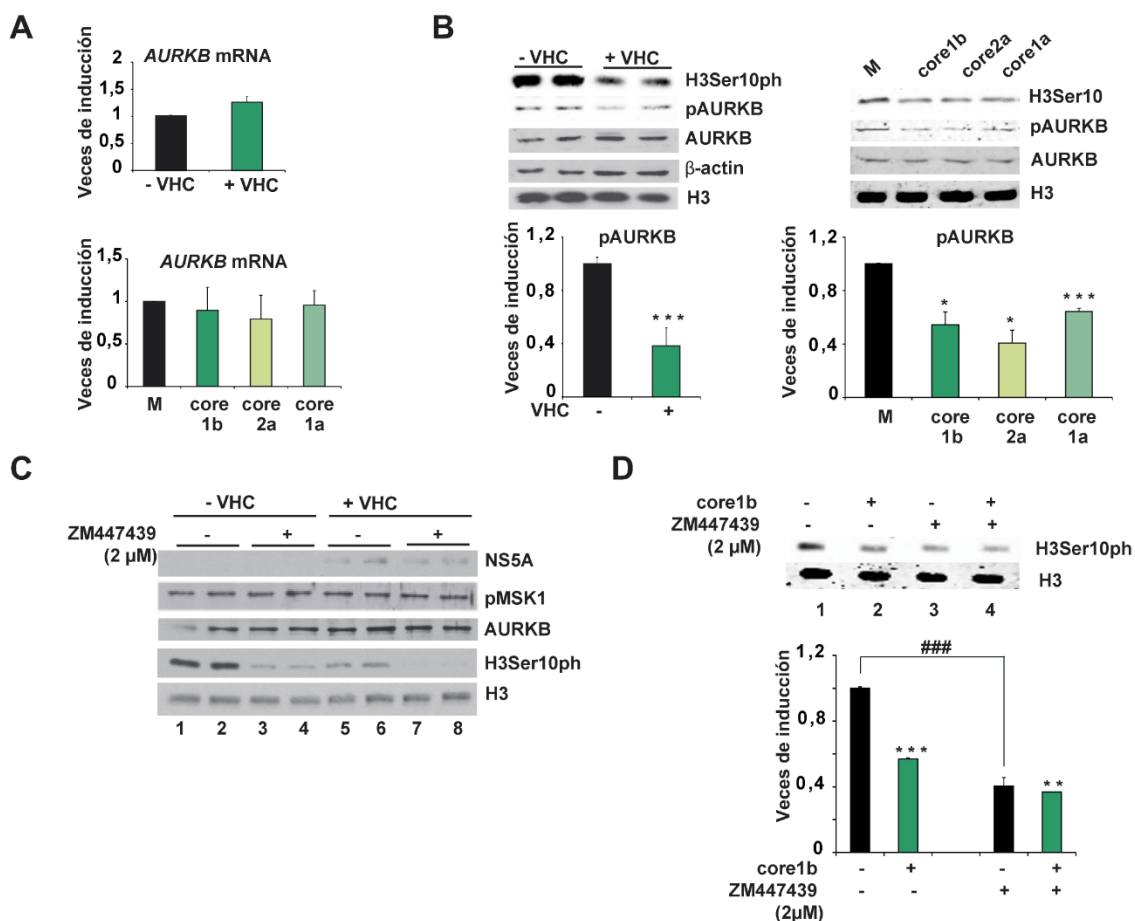
específicos. (B) Niveles de expresión de H3Ser10ph en células HuH7.5 transfectadas durante 72h con un vector pCMV vacío (M) o con un vector de expresión pCMV-Core de los genotipos 1a, 1b y 2a. (C) Niveles de H3Ser10ph tras la expresión del vector pCMV vacío (M) o pCMV-NS5a de los genotipos 1a, 1b y 2a. (D) Niveles de expresión de core y H3Ser10ph analizados mediante western blot en células HuH7.5 infectadas con el VHC o transfectadas con la proteína core del genotipo 2a. (E) Niveles de H3Ser10ph analizados mediante western blot en hepatocitos primarios humanos 72 horas después de haber sido transfectados con el vector pCMV vacío (M) o vector de expresión pCMV-Core del genotipo 2a. Como control de carga se utilizó un anticuerpo específico para la histona H3 o la GAPDH. Los niveles para las distintas marcas epigenéticas fueron cuantificados mediante densitometría y representados como veces de inducción a partir de al menos tres experimentos diferentes.

## **1.2. PAPEL DE LA AURKB EN LA DISMINUCIÓN DE LOS NIVELES DE H3SER10PH MEDIADA POR EL VHC Y LA PROTEÍNA VIRAL CORE**

La fosforilación de la histona H3 en el residuo de serina 10 está regulada por la acción de varias quinasas tales como la AURKB, MSK1 y RSK2, y fosfatasa como la PP1 y PP2A. Ya que previamente habíamos determinado que la disminución de esta marca epigenética estaba mediada, al menos, por la proteína viral core y se había descrito que la proteína del core modifica la activación de p38 MAPK [6], analizamos los niveles de la forma activa de MSK-1 utilizando para ello un anticuerpo contra su forma fosforilada (pMSK1). Sin embargo, cuando analizamos los niveles de P-MSK1, no observamos ningún cambio en su actividad en presencia del virus (*Figura 15 C*). La AURKB es otra de las quinasas responsables de la fosforilación del residuo de H3Ser10. Debido a que otros autores [75] habían afirmado previamente que la expresión del virus C disminuía los niveles de expresión de *AURKB*, analizamos si, en nuestro sistema, la infección por el VHC tenía algún efecto en la expresión de esta quinasa. Para ello, determinamos los niveles de RNA mensajero y de proteína mediante qRT-PCR y western blot respectivamente, y observamos que ni la infección por el VHC ni la sobreexpresión de la proteína viral core producían cambios en los niveles de expresión de mRNA ni de proteína de AURKB tras 72 horas de infección (*Figura 15 A, B*).

Ya que la AURKB es activa únicamente cuando es fosforilada en el residuo de treonina 232 y adquiere una conformación que le permite fosforilar a otras proteínas, analizamos la actividad de la quinasa mediante ensayos de western blot, empleando para ello un anticuerpo específico contra la forma fosforilada (pAURKB). Observamos cómo, tanto la infección por el VHC (*Figura 15 A*) como la expresión de la proteína core de los genotipos 1a, 1b y 2a (*Figura 15 B*) en células HuH7.5, provocaban una disminución en los niveles de AURKB fosforilada, coincidiendo con la disminución en la fosforilación de H3Ser10 observada. Con objeto de confirmar este resultado, las células fueron incubadas en presencia y ausencia de ZM447439, un inhibidor de la AURKB. Como cabría esperar, la inhibición de la actividad de la AURKB provocaba una disminución en la fosforilación basal de H3Ser10 cuando comparábamos células

sin infectar tratadas frente a no tratadas (*Figura 15 C, líneas 1-2 y 3-4*). Sin embargo, incluso después del tratamiento con ZM447439, el VHC era capaz de inhibir aún más los niveles de H3Ser10ph (*Figura 15 C, líneas 3-4 y 7-8*).



**Figura 15. La infección por VHC en células HuH7.5 disminuye la autofosforilación de AURKB.**

(A) Los niveles de expresión del mRNA de AURKB fueron analizados por qRT-PCR en células HuH7.5 infectadas y no infectadas con el VHC y, alternativamente en células HuH7.5 transfectadas transitoriamente con el vector de expresión de la proteína core perteneciente a los genotipos 1a, 1b y 2a. (B) Los niveles de AURKB total, AURKB fosforilada (pAURKB) y H3Ser10ph fueron analizados mediante ensayos de western blot a partir de células HuH7.5 infectadas y no infectadas por el VHC y en células transfectadas transitoriamente con el vector de expresión de la proteína core 1a, 1b y 2a. Como control de carga se utilizó un anticuerpo específico para la histona H3 y para la  $\beta$ -actina. Los niveles de pAURKB fueron cuantificados mediante densitometría y representados como unidades de inducción a partir de tres experimentos diferentes. (C) Células HuH7.5 infectadas y no infectadas por VHC fueron tratadas con 2  $\mu$ M de ZM443979 durante 30 minutos antes de la extracción de la fracción proteína. Las células controles fueron tratadas con DMSO. Los niveles de expresión de NS5A, pMSK1, AURKB, H3Ser10ph y H3 fueron analizados mediante hibridación con anticuerpos específicos. (D) Niveles de H3Ser10ph en células HuH7.5 tras la expresión de la proteína core del genotipo 1b incubadas en presencia y ausencia de ZM443979. Los niveles de H3Ser10ph fueron cuantificados mediante densitometría y representados como unidades de inducción a partir de tres experimentos diferentes.

Por otro lado, llevamos a cabo el mismo experimento en células transfectadas con el plásmido pCMV-HA vacío o con el que contiene la secuencia codificante de la proteína viral core del genotipo 1b. De la misma manera, el tratamiento con ZM447439 provocaba una

disminución en los niveles basales de H3Ser10ph (*Figura 15 D, líneas 1 y 3*). Como ya habíamos observado anteriormente, la proteína del core producía también una inhibición en los niveles de H3Ser10ph en ausencia de ZM447439. Sin embargo, en presencia del tratamiento, se suprimía completamente el efecto inhibitorio mediado por core sobre la marca epigenética, a diferencia de los resultados que habíamos observado tras la infección con el VHC (*Figura 15 D, líneas 3 y 4*).

Todos estos datos parecían indicar que el VHC, a través de la proteína core, era capaz de disminuir la actividad de la quinasa AURKB y reducir los niveles de H3Ser10ph en las células huésped.

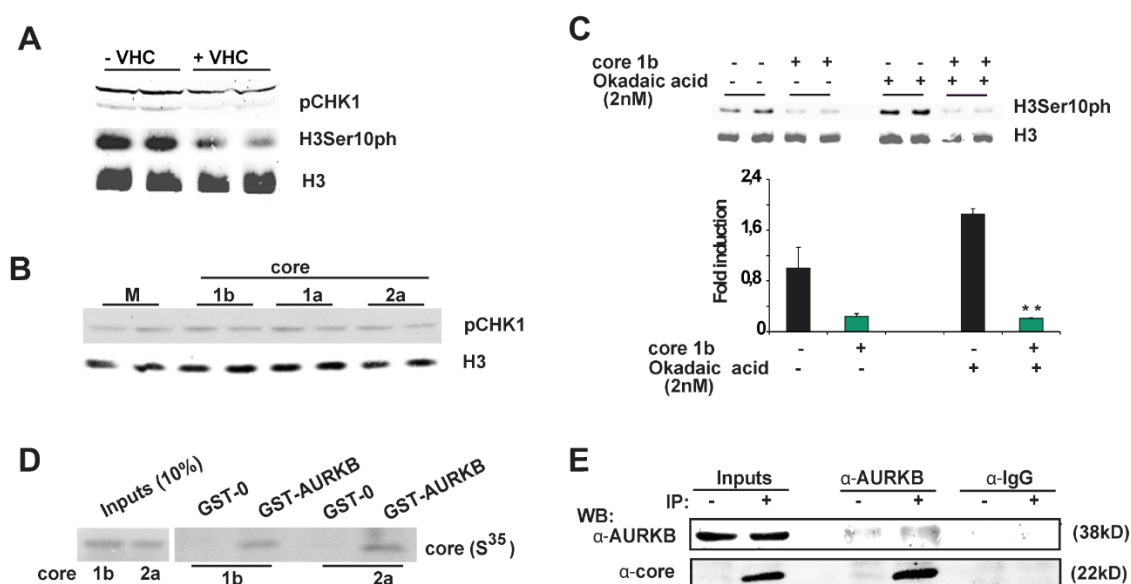
### **1.3. INTERACCIÓN ENTRE LA AURKB Y LA PROTEÍNA VIRAL CORE**

La proteína quinasa CHK1 es requerida para una correcta regulación de AURKB durante la mitosis, donde lleva a cabo la fosforilación de la AURKB en el residuo de Ser331 promoviendo la activación completa de la AURKB. Por otro lado, la proteína CHK1 es activada mediante la fosforilación de la Ser317. Para determinar si la infección por el VHC regula la actividad de la CHK1 y, por lo tanto, indirectamente la actividad de AURKB, infectamos células HuH7.5 con VHC y, alternativamente, sobreexpresamos la proteína core en las mismas células. En la figura 16 A se observa que la infección por el VHC produjo una disminución de la forma fosforilada de la CHK1 y, por lo tanto, de su actividad; mientras que la expresión de la proteína core no produjo ningún efecto (*Figura 16 B*). Por lo que, la disminución en la actividad de la quinasa AURKB mediada por core no tiene lugar a través de la CHK1.

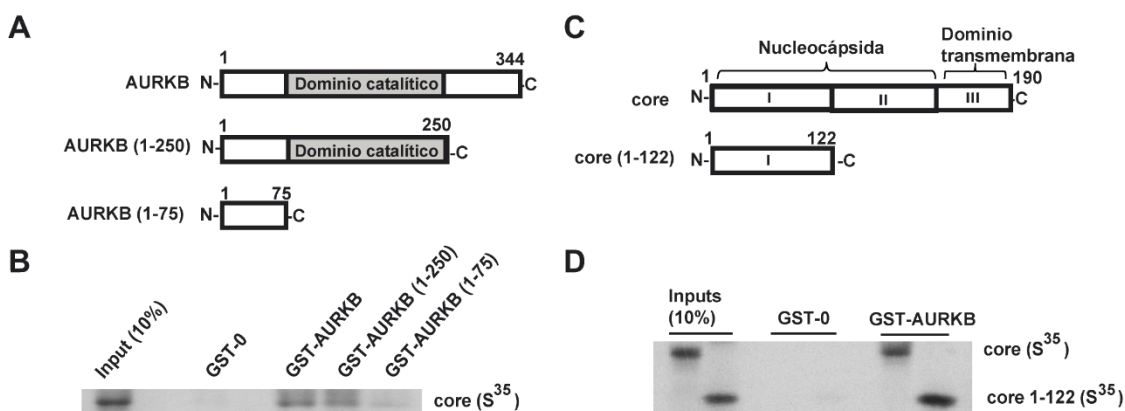
A continuación, nos planteamos si la fosforilación del residuo de H3Ser10 en presencia de core podría estar mediada por las fosfatasa PP1 y PP2A, ya que estas fosfatasas inhiben la fosforilación de la AURKB y, por lo tanto, su actividad [75]. Además, varios estudios han descrito como el VHC induce la sobreexpresión de PP2A [65]; por lo que nos planteamos analizar si un aumento en los niveles de PP2A podía mediar la disminución observada en la actividad de la quinasa AURKB tras la sobreexpresión de la proteína core. Para lo cual, células HuH7.5 fueron transfectadas con un vector de expresión de la proteína core o con el vector vacío e incubadas en ausencia y presencia de ácido okadaico 2 nM, un inhibidor de la fosfatasa. Como cabría esperar, el tratamiento con ácido okadaico produjo un aumento en el nivel basal de H3Ser10ph en las células transfectadas con el vector vacío confirmando el efecto inhibitorio de la PP2A sobre la actividad de la AURKB. Sin embargo, el tratamiento con ácido okadaico no eliminó el efecto inhibitorio mediado por core en esta marca epigenética (*Figura 16 C*). Estos datos parecen indicar un efecto directo de la proteína del core sobre la AURKB.

Ya que la expresión de la proteína core no estaba regulando la actividad de CHK1 ni de

PP2A y otros estudios habían demostrado la existencia de múltiples interacciones entre las proteínas codificadas por el VHC y proteínas implicadas en la regulación del ciclo celular, nos preguntamos si podría existir una interacción directa entre la proteína del core y AURKB. Con el fin de determinar esta cuestión, realizamos un ensayo de interacción de proteínas *in vitro* o *pull down* (Figura 16 D) en el que efectivamente observamos que las proteínas del core de los genotipos 1b y 2a interaccionaban directamente con Aurora B, pero no con la proteína *glutathione S-transferase*, utilizada como control negativo. Posteriormente la interacción entre ambas proteínas fue confirmada mediante ensayos de coimmunoprecipitación en células HuH7.5 previamente transfectadas con la proteína viral core (Figura 16 E).



también mutantes de delección de la región carboxi-terminal de la proteína viral core (Figura 17 C) y observamos que la región de la proteína necesaria para establecer la interacción se encuentra en los primeros 122 aminoácidos (Figura 17 D).



**Figura 17. El dominio catalítico de la AURKB interacciona con la región de la nucleocápsida de core.**

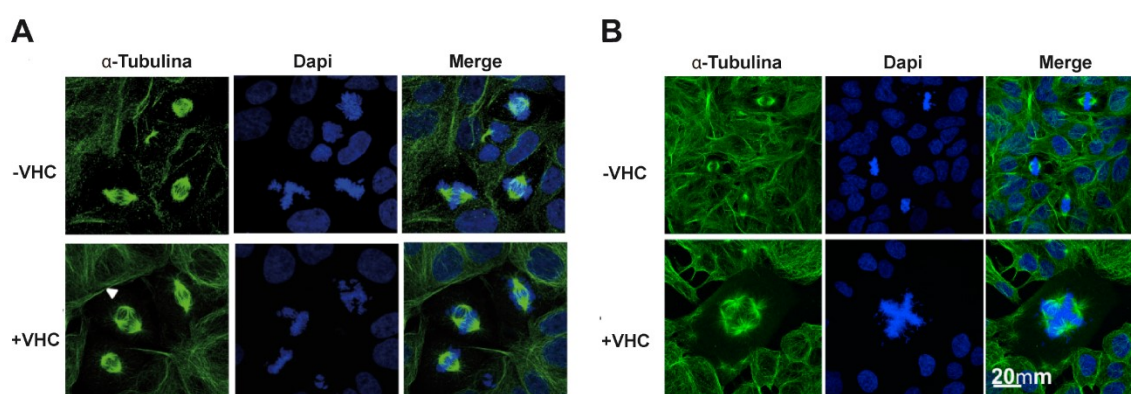
(A) Representación esquemática de las proteínas de fusión GST-AURKB *wild type* y los mutantes de delección de la región carboxi terminal GST-AURKB (1-250) y GST-AURKB (1-75) empleadas en ensayos de interacción de proteínas *in vitro* o *pull down*. (B) Las proteínas de fusión GST fueron purificadas y se analizó su interacción con la proteína core marcada con  $^{35}\text{S}$ -metionina. (C) Representación esquemática de la proteína core salvaje y de una construcción que contenía los 122 primeros aminoácidos del dominio de la nucleocápsida. (D) Ensayos de interacción *in vitro* de GST-0 y GST-AURKB con las construcciones de core traducidas *in vitro* en presencia de  $^{35}\text{S}$ -metionina.

#### **1.4. ALTERACIÓN DE LA PROLIFERACIÓN Y VIABILIDAD CELULAR MEDIADO POR LA INFECCIÓN POR EL VHC Y LA EXPRESIÓN DE CORE**

La AURKB es esencial en el mantenimiento de la estabilidad cromosómica y en el proceso de división celular [71]. La desregulación de la actividad de esta quinasa inducida por la infección por el VHC podría provocar alteraciones en la formación del huso mitótico durante el proceso de mitosis. Por ello, llevamos a cabo un marcaje doble utilizando Dapi para ver los núcleos y un anticuerpo contra  $\alpha$ -Tubulina para visualizar los husos mitóticos en células infectadas por VHC y células controles (Figura 18 A, B). Curiosamente, las células infectadas por el VHC mostraban un incremento del 10% en el número de células con husos mitóticos multipolares en comparación con las células no infectadas. Este resultado sugiere que la infección por el VHC induce alteraciones en el proceso de mitosis.

Alteraciones en la regulación del proceso de mitosis pueden afectar a la proliferación y a la viabilidad celular. Por lo que a continuación analizamos el efecto de la inhibición en la actividad de la AURKB inducido por el VHC sobre la proliferación celular. Para ello, células infectadas y no infectadas por el VHC fueron marcadas con un anticuerpo anti-H3Ser10ph con el fin de determinar el número de células en mitosis. Observamos que el número de células en división disminuía tras la infección por el VHC (Figura 19 A). Con el fin de confirmar estos

resultados, el efecto de la infección por el VHC en la proliferación celular fue analizado también mediante conteo de células a las 24, 48, 96 y 144 h después de la infección viral. Tanto las células infectadas como el control de células sin infectar aumentaron la tasa de proliferación de manera sostenida durante las primeras 72 horas tras la infección. Sin embargo, 144 horas después de la infección por el VHC, las células infectadas mostraban una disminución de un 37% en el número de células en comparación con las células no infectadas (*Figura 19 B*). Determinamos también la viabilidad celular mediante ensayos de MTT. Aunque la viabilidad celular también se vio disminuida, las células continuaban proliferando y siendo metabólicamente activas, al menos hasta 144 horas después de la infección (*Figura 19 C*)



**Figura 18. La infección por el VHC induce anomalías en el proceso de mitosis.**

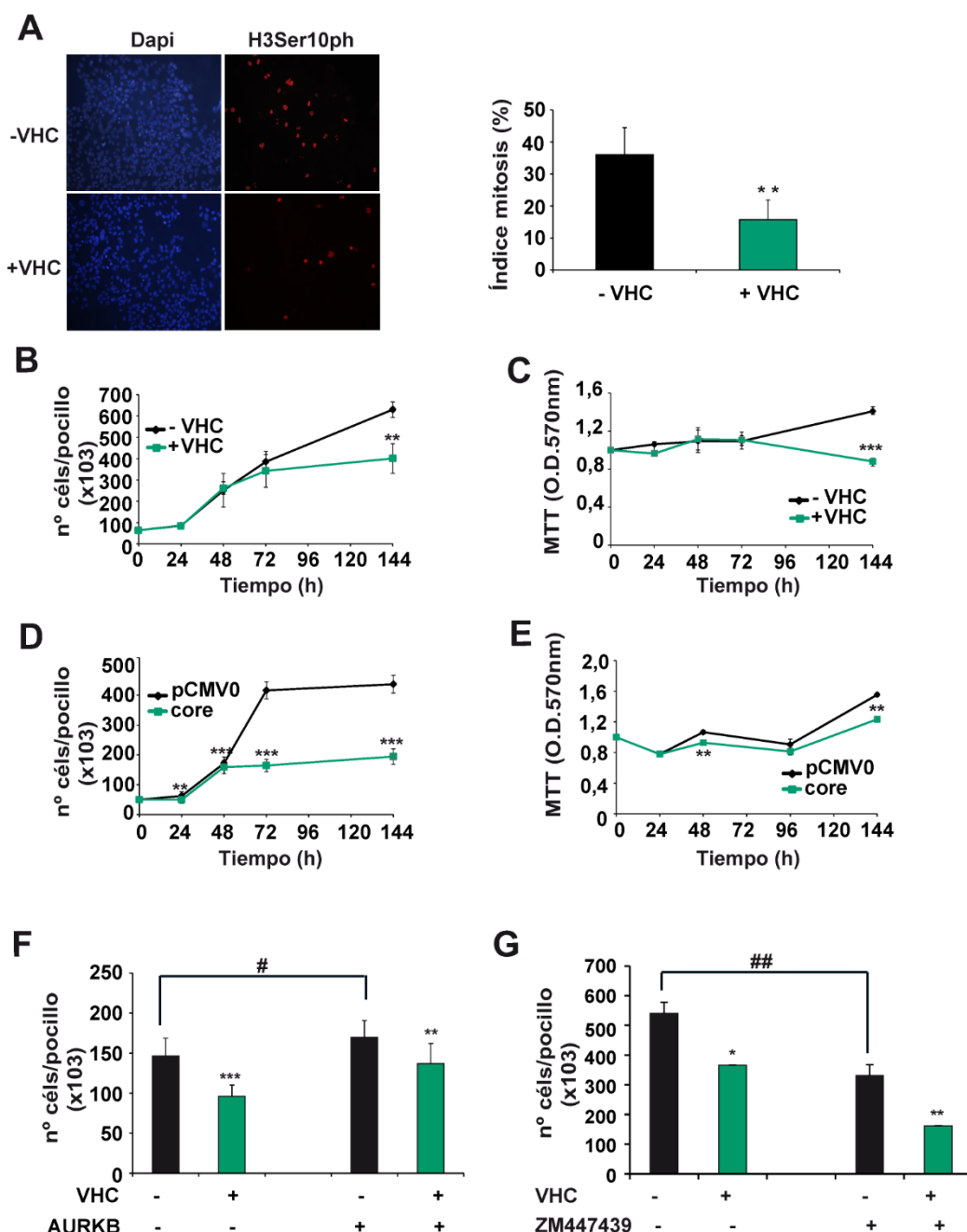
(A, B) Inmunofluorescencia de células HuH7.5 infectadas y no infectadas por el VHC. 72 horas después de la infección, las células fueron teñidas con  $\alpha$ -Tubulina para visualizar los husos mitóticos y el DNA se marcó con Dapi.

Los mismos experimentos fueron realizados en células HuH7.5 transfectadas transitoriamente con la proteína viral core. En estos ensayos observamos que la presencia de la proteína viral producía una notable disminución en el número de células a las 144 horas (*Figura 19 D*) observándose también una ligera disminución en la viabilidad celular (*Figura 19 E*).

Con el objetivo de determinar si el efecto observado en la proliferación podía deberse a una disminución en la actividad de AURKB, medimos la proliferación celular de células previamente infectadas con VHC y transfectadas con un vector de expresión de AURKB. Como muestra la figura 19 F, la sobreexpresión de la quinasa aumentaba ligeramente la tasa de proliferación basal observada en las células HuH7.5 sin infectar. Además, la sobreexpresión de AURKB revertía parcialmente la inhibición en la proliferación observada en células infectadas. Por otro lado, cuando inhibimos la actividad de la quinasa empleando ZM447439, observamos que se producía una inhibición de la proliferación basal en células no infectadas y, en presencia del virus y del inhibidor, la disminución en la proliferación era aún mayor (*Figura 19 G*), indicando que el VHC reduce la proliferación celular a través de mecanismos adicionales. En conjunto, todos estos resultados parecen indicar que la inhibición de la AURKB mediada por el



VHC podría ser uno de los mecanismos que el virus utiliza para disminuir la proliferación y viabilidad celular.



**Figura 19. La infección por el VHC inhibe la proliferación y la viabilidad celular.**

(A) Inmunofluorescencia de células HuH7.5 infectadas y no infectadas con VHC, marcadas mediante tinción con Dapi. Las células en división fueron marcadas con un anticuerpo contra H3Ser10ph. Se contaron un total de 1000 células en interfase y en mitosis y el índice mitótico se representó expresado en porcentaje. Se realizaron 3 experimentos independientes. (B, D) Células HuH7.5 infectadas con el VHC o transfectadas con la proteína core fueron teñidas con *Trypan blue* al 0.4% y cuantificadas a los tiempos indicados. (C, E) La viabilidad celular fue analizada a los tiempos indicados con el reactivo MTT en células HuH7.5 infectadas con el VHC o transfectadas con la proteína core. La actividad metabólica fue calculada considerando el valor de los controles a tiempo 0 como 1 (n=3). (F) Cuantificación del número de células HuH7.5 infectadas y sin infectar en ausencia y presencia de AURKB (n=2 con triplicados) (G) Células HuH7.5 infectadas con VHC y sin infectar fueron tratadas con el inhibidor ZM447439 durante 72 horas y se determinó el número de células por pocillo. # indica las diferencias en los niveles de proliferación

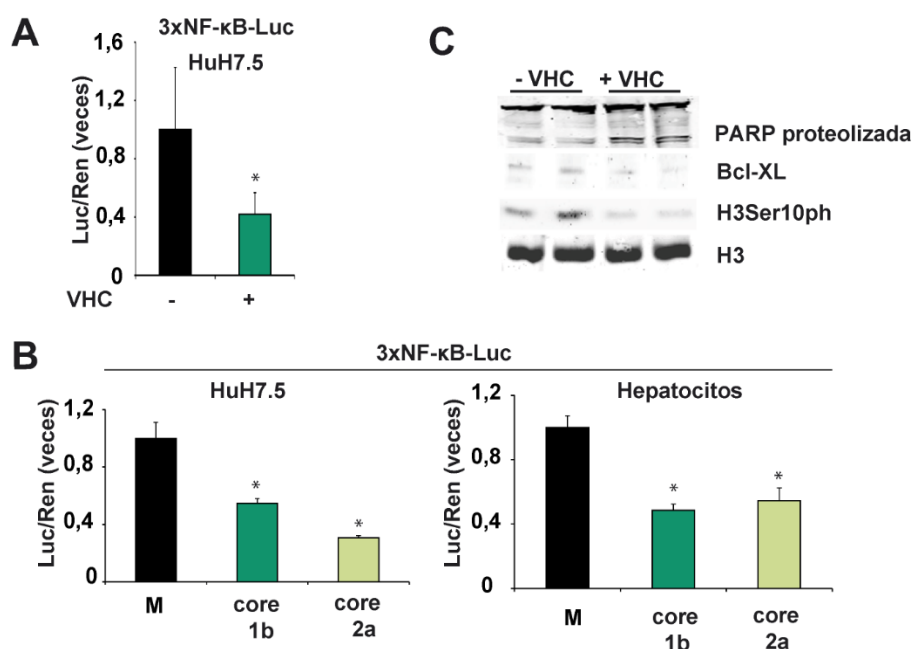
celular de células no infectadas que sobreexpresan AURKB o están tratadas con ZM447439 con respecto a células no infectadas sin sobreexpresar AURKB o sin tratar con el inhibidor y \* entre células infectadas y no infectadas. \* y #  $P > 0.05$ , \*\* y ##  $P < 0.01$ ; \*\*\* y ###  $P < 0.001$ .

### **1.5. LA INFECCIÓN POR VHC Y LA EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA CORE DISMINUYEN LA TRANSCRIPCIÓN DEL PROMOTOR DE *NF-κB***

Un efecto de la infección por VHC es la inducción de procesos inflamatorios que contribuyen a la fibrogénesis y al desarrollo de CHC. Como hemos observado previamente, la infección del VHC y la expresión de la proteína core provocan una disminución en la proliferación y viabilidad celular, por lo que quisimos analizar si la presencia del virus o de la proteína viral del core modificaban la transcripción del gen que codifica para *NF-κB*, ya que este factor de transcripción juega un papel importante en los procesos de inflamación, proliferación celular y supervivencia. Para ello, cinco horas después de la infección, las células HuH7.5 fueron transfectadas de manera transitoria con un plásmido *reporter* de luciferasa que contiene tres copias del sitio de unión de *NF-κB* (3xNF-κB-luc). Tras 72 horas, las proteínas fueron recogidas y se midió la actividad luciferasa (*Figura 20 A*), observando que la transcripción del gen *NF-κB* disminuía de manera significativa en las células infectadas con VHC cuando lo comparábamos con los niveles basales en células sin infectar. Quisimos también analizar el efecto de la expresión de la proteína core en la transcripción de *NF-κB*. Células HuH7.5 fueron transfectadas con 3xNF-κB-luc junto con un vector vacío (pCMV-HA) o con un vector de expresión de la proteína core (pCMV-Core) de los genotipos 1b y 2a. Esta misma aproximación fue llevada a cabo en hepatocitos primarios. En ambos tipos celulares (*Figura 20 B*), la transcripción del plásmido *reporter* 3xNF-κB-luc disminuía en presencia de la proteína core de ambos genotipos.

Ya que NF-κB es considerado uno de los principales agentes anti-apoptóticos en hígado, y además habíamos observado una disminución en la proliferación celular junto con una disminución en la transcripción de *NF-κB* en presencia del VHC, medimos los niveles de poli ADP-ribosa polimerasa (PARP), un sustrato específico de caspasas que es proteolizado en apoptosis. Realizamos ensayos de western blot utilizando anticuerpos que detectaban selectivamente tanto la forma proteolizada y activa como el precursor inactivo de PARP y observamos que la infección por VHC inducía la proteólisis de PARP (*Figura 20 C*) indicando un aumento en apoptosis. Para confirmar este resultado, analizamos también la expresión de Bcl-XL, una proteína anti-apoptótica, observando que su expresión era menor en células infectadas por VHC. Este aumento en apoptosis va en concordancia con la disminución de la transcripción de *NF-κB* que habíamos observado.

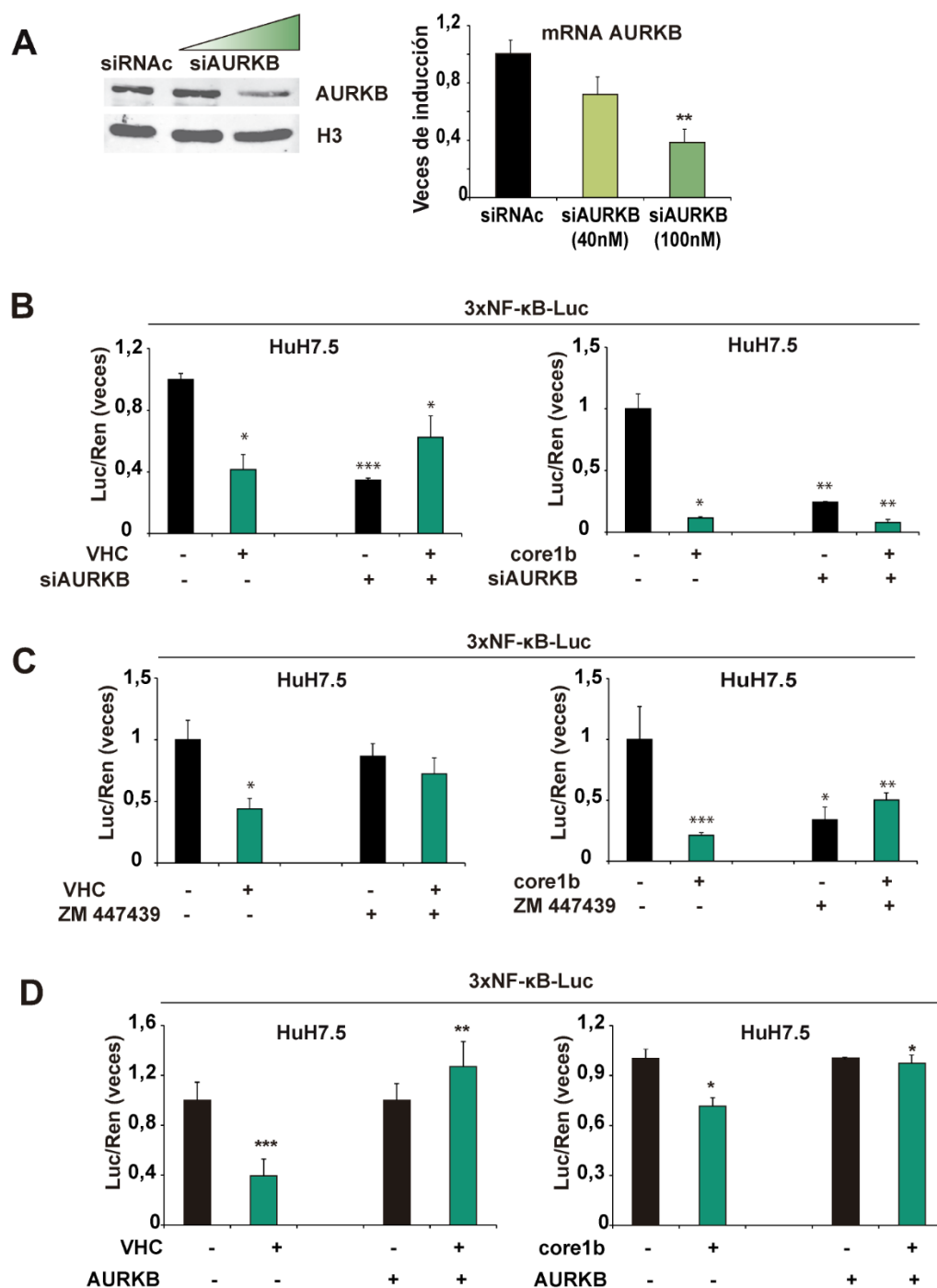




**Figura 20. El VHC y la proteína del core inhiben la transcripción de *NF-κB*.**

(A) Células HuH7.5 no infectadas e infectadas con VHC transfectadas con el plásmido *reporter* 3xNF-κB-Luc. 72 horas tras la transfección se evaluó la actividad luciferasa de tres experimentos independientes llevados a cabo con triplicado. (B) La actividad transcripcional de 3xNF-κB-Luc se determinó en presencia y ausencia de la proteína core de los genotipos 1b y 2a en células HuH7.5 (izquierda) y en hepatocitos primarios (derecha). (C) Determinación de los niveles de expresión de PARP proteolizado, Bcl-XL y H3Ser10ph en células HuH7.5 infectadas con VHC frente a células sin infectar. Como control de carga se utilizó la histona H3.

Publicaciones previas de otros grupos y del nuestro han demostrado que la AURKB participa en la regulación de la transcripción génica aumentando la fosforilación del residuo H3Ser10 [100-102]. Ya que la proteína viral core disminuye la actividad de AURKB, nos preguntamos si la inhibición de la expresión de la AURKB anulaba la represión en la transcripción de *NF-κB* mediada por core. Para lo cual, células HuH7.5 fueron infectadas por el VHC o transfectadas con la proteína core junto con un siRNA de AURKB. En primer lugar, testamos la eficacia del siRNA a diferentes concentraciones (40 y 100 nM) y observamos que a 100 nM se producía una reducción de alrededor del 60% en los niveles de AURKB (Figura 21 A). En estas condiciones observamos como la reducción en la expresión de AURKB era suficiente para disminuir los niveles basales de transcripción del gen *reporter* 3xNF-κB-luc de manera significativa. Esta inhibición resultaba en una reducción del efecto inhibitorio mediado por la infección por VHC o la expresión de la proteína core en la regulación de la transcripción de *NF-κB* (Figura 21 B). De la misma manera, el tratamiento de las células con ZM447439 redujo la represión de la transcripción del gen de *NF-κB* provocado por el VHC y por la proteína core (Figura 21 C).



**Figura 21. La inhibición en la transcripción de *NF-κB* provocada por VHC y core está mediada por una alteración en la actividad de la AURKB.**

(A) Análisis de los niveles de mRNA y proteína de AURKB en presencia de cantidades crecientes de siRNA-AURKB frente a un siRNA no relacionado utilizado como control negativo. (B) Actividad luciferasa de 3xNF-κB-Luc tras la depleción de AURKB mediante el uso del siAURKB en células HuH7.5 infectadas y no infectadas por VHC (izquierda) o células expresando la proteína core1b (derecha). (C) Actividad transcripcional de NF-κB en células infectadas por el VHC (izquierda) o células HuH7.5 transfectadas con pCMV-core1b en presencia y ausencia de 2 μM de ZM447439. (D) Células HuH7.5 infectadas o expresando la proteína core1b fueron co-transfectadas con el gen *reporter* 3xNF-κB-luc en ausencia y presencia de pcDNA-AURKB. La cuantificación de la actividad luciferasa de todos los experimentos (A, B, C, D) recoge los resultados de al menos tres experimentos independientes llevados a cabo por triplicado.

Por otro lado, sobreexpresamos la AURKB conjuntamente con el vector *reporter* 3xNF-κB-

luc en células infectadas y no infectadas con VHC. Tras 72 horas, determinamos la actividad de luciferasa observando que la expresión de AURKB no modificaba la transcripción basal del gen, sin embargo, revertía la disminución de la transcripción de *NF-κB* mediada por el virus (*Figura 21 D*). Realizamos este ensayo también en células HuH7.5 co-transfectadas con el vector de expresión de la proteína core1b (pCMV-core1b) y AURKB (pCDNA3-Flag AURKB) junto con el vector 3xNF-κB-luc. De nuevo, la sobreexpresión de AURKB revertía el efecto inhibitorio sobre la transcripción de *NF-κB* inducido por la proteína core (*Figura 21 D*).

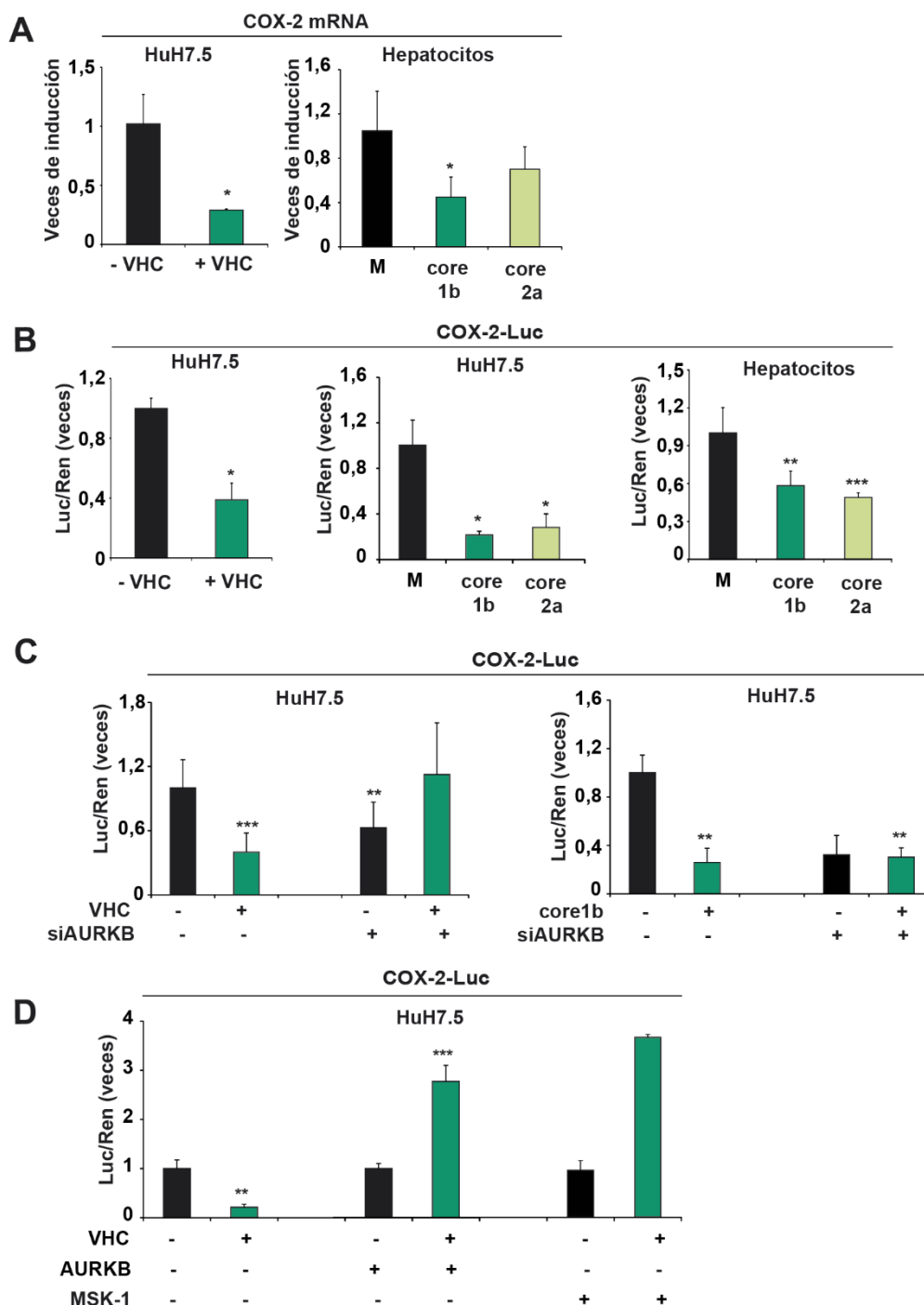
## **1.6. LA INFECCIÓN POR VHC Y LA EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA CORE DISMINUYEN LA TRANSCRIPCIÓN DEL PROMOTOR Y LA EXPRESIÓN DEL GEN COX-2**

NF-κB regula la expresión del gen *COX-2*, implicado en inflamación, anti-apoptosis y carcinogénesis [31]. Por este motivo, realizamos ensayos de QRT-PCR en células HuH7.5 infectadas con VHC, observando que la infección viral provocaba una inhibición de la expresión endógena del gen *COX-2* de la misma manera que la sobreexpresión de core perteneciente a los genotipos 1b y 2a en hepatocitos primarios (*Figura 22 A*). Para confirmar el efecto del virus sobre la expresión de *COX-2*, analizamos la transcripción de un gen *reporter* de luciferasa unido al promotor de *COX-2* (pCOX-2-luc). La expresión de luciferasa se vio reducida en las células infectadas cuando comparábamos con células control sin infectar (*Figura 22 B*). La expresión de core también inhibió la actividad transcripcional del promotor de *COX-2* tanto en células HuH7.5 como en hepatocitos primarios (*Figura 22 B*).

A continuación, suprimimos la expresión de la AURKB mediante el uso de siRNA (siAURKB) dando lugar a una disminución basal en la transcripción de *COX-2* en células no infectadas y suprimiendo el efecto represor mediado por la infección de VHC o por la expresión de la proteína viral core en concordancia con los resultados obtenidos en el ensayo de transcripción de NF-κB (*Figura 22 C*).

Por otro lado, ya que MSK-1 es un regulador de la transcripción del gen *COX-2* mediante la fosforilación de H3Ser10, tratamos de revertir el efecto inhibidor mediado por el VHC a nivel transcripcional mediante la sobreexpresión de un vector de expresión de MSK-1. Las células infectadas con VHC que expresaban MSK-1 mostraban una actividad transcripcional de *COX-2* mayor que las células infectadas que no expresaban MSK-1 (*Figura 22 D*). En el mismo experimento, analizamos también el efecto de la sobreexpresión de AURKB en la transcripción de *COX-2* en células infectadas con VHC y células sin infectar. Los resultados fueron similares a los obtenidos tras la sobreexpresión de MSK-1, es decir, la AURKB fue capaz de suprimir el

efecto inhibitorio a nivel transcripcional del gen *COX-2* producido por el virus C (Figura 22 D).



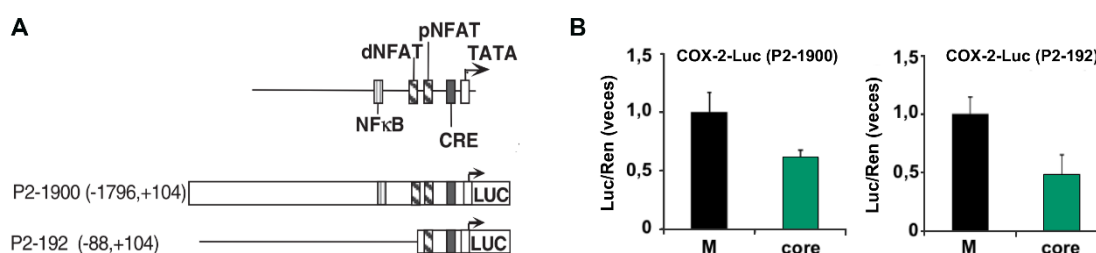
**Figura 22. El VHC y la proteína viral core inhiben la expresión y transcripción del gen *COX-2*.**

(A) Niveles de mRNA de *COX-2* determinados por qRT-PCR a partir del RNA extraído de células HuH7.5 sin infectar o infectadas con el VHC y en hepatocitos primarios expresando la proteína viral core de los genotipos 1b y 2a. Los valores se expresaron en veces de inducción con respecto al control sin infectar o transfectado con el vector de expresión vacío pCMV-0, y se corrigieron por los niveles de expresión del mRNA del gen GAPDH. (B) La actividad transcripcional de *COX-2* se determinó en células HuH7.5 infectadas y no infectadas con VHC (izquierda), en presencia y ausencia de la proteína core de los genotipos 1b y 2a (centro) y en hepatocitos primarios expresando core 1b y core 2a (derecha). (C) Actividad luciferasa de *COX-2-luc* tras la depleción de AURKB mediante siAURKB en células HuH7.5 infectadas y no infectadas por VHC (izquierda) o células expresando la proteína core1b (derecha). (D) Células HuH7.5 infectadas y no infectadas con el VHC y transfectadas con el vector *reporter* de *COX2-luc*

junto con el vector de expresión de AURKB (pcDNA3-FLAG-AURKB) o de MSK-1 (pcDNA3-FLAG-MSK-1). A las 72 horas, se evaluó la actividad luciferasa. La cuantificación estadística corresponde a los resultados de al menos tres experimentos independientes llevados a cabo con triplicados.

Todos estos datos sugieren que el VHC y la proteína core, a través de la regulación de la actividad de AURKB, controlan la transcripción de importantes genes implicados en la respuesta inflamatoria.

La expresión de *COX-2* a nivel de transcripción está regulada por la acción de varios factores de transcripción tales como NF- $\kappa$ B, C/EBP, CREB, NFAT o AP-1 [94]. Con el fin de determinar si la regulación sobre la actividad transcripcional de *COX-2* ejercida por la infección con VHC y por core era mediada a través de NF- $\kappa$ B utilizamos una construcción del promotor de *COX-2* que no incluía el sitio de unión a NF- $\kappa$ B, p-COX-2-luc (P2-192). La figura 23 A muestra como en ausencia de la región de unión del factor NF- $\kappa$ B, se sigue observando el efecto inhibitorio mediado por core (Figura 23 B).



**Figura 23. La inhibición de la transcripción del gen de la *COX-2* no está mediado por NF- $\kappa$ B.**

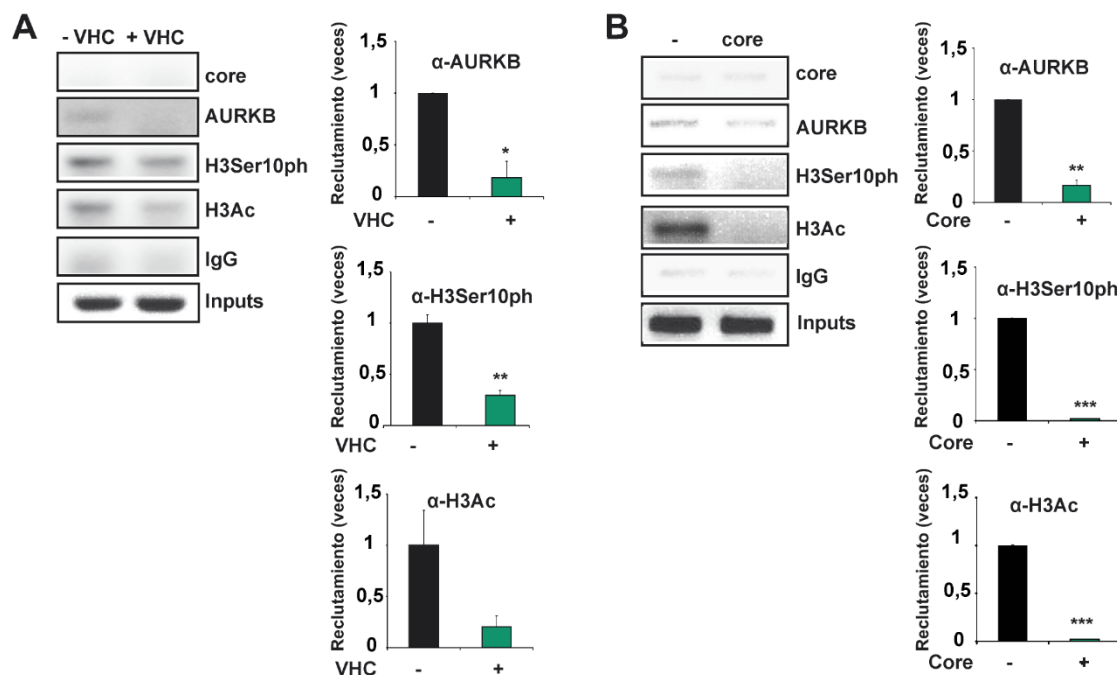
(A) Esquema del promotor del gen *COX-2* y de las construcciones de los plásmidos *reporter* empleados en nuestro estudio (Imagen modificada de [94]). (B) La actividad transcripcional de *COX-2* se determinó en células HuH7.5 en presencia y ausencia de la proteína core del genotipo 1b. Los valores se expresaron en veces de inducción con respecto al control transfectado con el vector de expresión vacío pCMV-0 (M).

## 1.7. REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE *COX-2* A NIVEL DE PROMOTOR

El resultado anterior, junto con la disminución en los niveles globales de H3Ser10ph observada, sugieren que el virus podría estar regulando la expresión de *COX-2* mediante modificaciones epigenéticas. Por lo que analizamos el promotor de *COX-2* mediante un ensayo de ChIP.

Nuestros resultados (Figura 24 A) muestran que, en células infectadas, los niveles de histona H3 acetilada (H3Ac) y de H3Ser10ph en el promotor de *COX-2* se ven reducidos con respecto a los niveles observados en células sin infectar, coincidente con la inhibición en la transcripción de este gen. Como cabría esperar, core no se recluta en el promotor de *COX-2*. A continuación, analizamos también el reclutamiento de AURKB en el promotor de *COX-2*.

Nuestros resultados muestran como en células no infectadas, la AURKB se asocia al promotor de este gen, y esta asociación se ve reducida en presencia del VHC.



**Figura 24. La infección por el VHC y la expresión de la proteína viral core reducen el reclutamiento de AURKB al promotor de *COX-2* y los niveles de H3Ser10ph y H3Ac, relacionados con la actividad transcripcional.**

Ensayo de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) con los anticuerpos indicados en células HuH7.5 infectadas con el VHC (A) o transfectadas con la proteína viral core (B). El DNA inmunoprecitado se cuantificó mediante qRT-PCR con primers específicos para la región promotora del gen *COX-2* y, posteriormente, se visualizó en geles de agarosa. Las gráficas representan la media  $\pm$  desviación estándar (n >3).

Este ensayo fue realizado también en células HuH7.5 sobreexpresando la proteína viral core y los resultados fueron similares. Es decir, los niveles de H3Ac, H3Ser10ph y AURKB se vieron reducidos como resultado de la expresión de core (Figura 24 B).

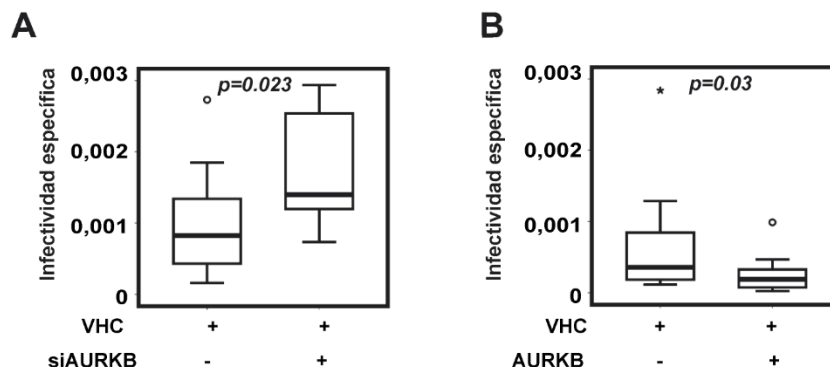
Estos datos sugieren que tanto el VHC como la proteína core regulan la transcripción de genes importantes implicados en la ruta inflamatoria mediante mecanismos epigenéticos, a través de la inhibición de la actividad de la AURKB.

### **1.8. EFECTO DE LA AURKB EN LA GENERACIÓN DE PROGENIE INFECCIOSA**

Como hemos visto, la respuesta inflamatoria era inhibida en los estadios tempranos de la infección por el VHC mediante la inhibición de la AURKB. Por ello, analizamos si la ausencia de la expresión de la AURKB podría estar afectando también a la producción de partículas virales. Cinco horas después de que las células HuH7.5 fueran infectadas con VHC, transfectamos las mismas con siRNA de Aurora B (siAURKB). A las 72 horas del silenciamiento de la AURKB, la

infectividad específica del VHC aumentó alrededor del 66% ( $p=0.023$ ) (Figura 25 A).

Por otro lado, analizamos también el efecto de la sobreexpresión de la AURKB. Cinco horas después de que las células HuH7.5 fueran infectadas con el VHC, sobreexpresamos la quinasa con un vector de expresión de AURKB y un vector vacío como control. A las 72 horas de la transfección, la infectividad extracelular del virus se vio disminuida un 57% ( $p=0.03$ ) (Figura 25 B). Estos resultados sugieren que la interacción entre la proteína viral core y AURKB podría regular la formación de partículas virales.



**Figura 25. La expresión de la AURKB regula la infectividad extracelular del VHC.**

(A) Análisis de la infectividad específica del VHC por titulación viral tras la depleción de AURKB mediante la transfección transitoria de siAURKB (150 nM) o de un siRNA control. Los datos proceden de la realización de dos experimentos con un número total de 13 muestras por grupo. (B) La infectividad específica del VHC se evaluó por titulación viral tras la sobreexpresión de la quinasa AURKB a partir de cuatro experimentos diferentes con un total de 17 muestras por grupo.

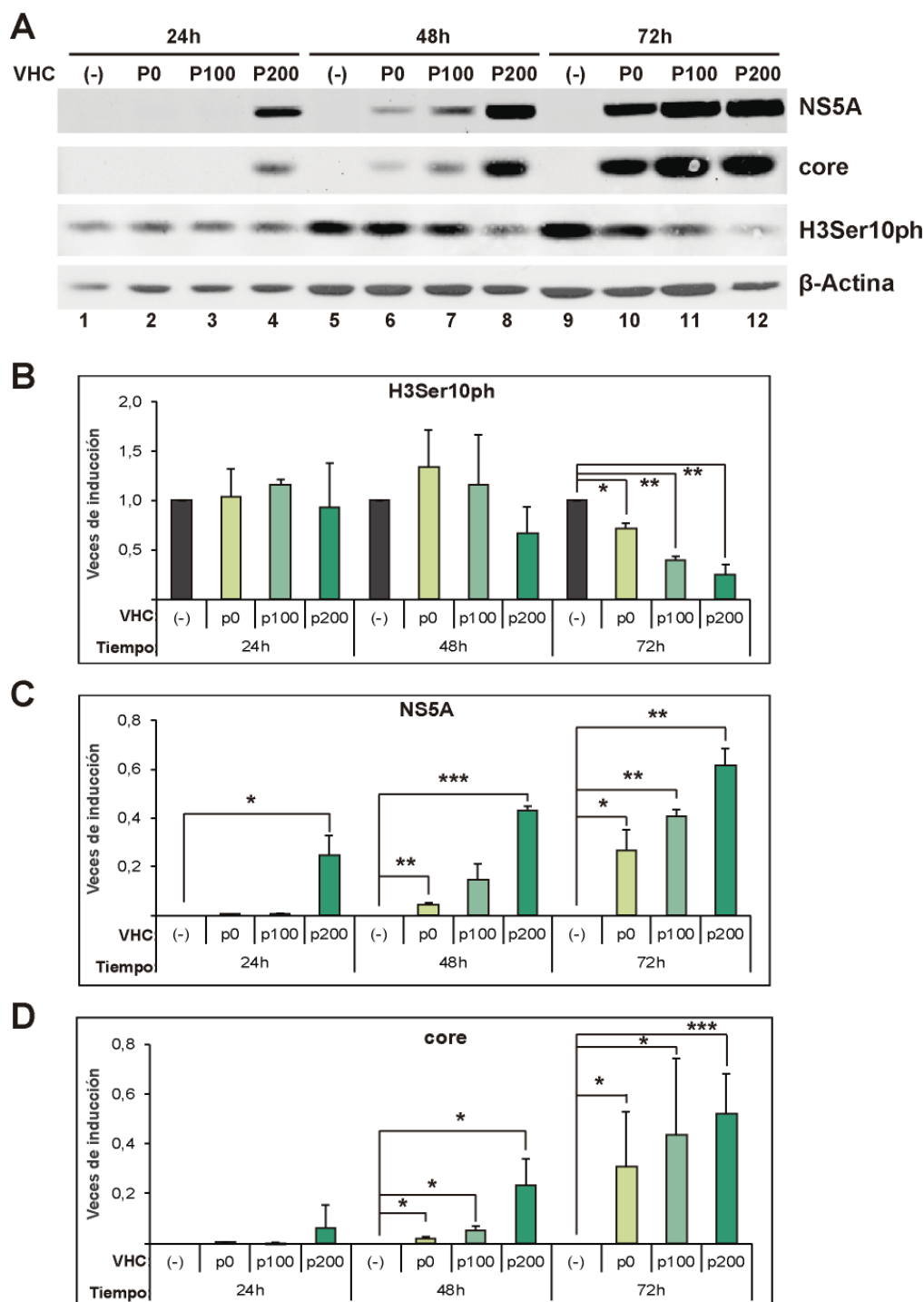
## **2. ANÁLISIS DEL EFECTO DEL TRATAMIENTO CON DAAs EN LA REVERSIÓN DE LOS CAMBIOS EPIGENÉTICOS INDUCIDOS POR EL VHC**

### **2.1. ANÁLISIS DE LA DINÁMICA DEL ESTABLECIMIENTO DE MARCAS EPIGENÉTICAS TRAS LA INFECCIÓN POR EL VHC**

Durante el desarrollo de esta tesis doctoral se han desarrollado los tratamientos actuales con DAAs, que han sido claves en la inhibición de la replicación del VHC, consiguiendo tasas de curación superiores al 95%. Ya que nuestros resultados habían mostrado la implicación de mecanismos epigenéticos en la regulación de la respuesta proinflamatoria relacionada con la expresión de *NF- $\kappa$ B* y *COX-2* mediada por el VHC, nos planteamos si el tratamiento con DAAs podría revertir los efectos epigenéticos observados tras la infección por VHC.

Para realizar estos experimentos, previamente determinamos la cinética que seguía el establecimiento de las alteraciones epigenéticas promovidas por el virus VHC-p0, recogiendo los extractos de proteínas a diferentes tiempos post-infección (24, 48 y 72 horas, Figura 26 A; líneas 2, 6 y 10 respectivamente). Estas proteínas se sometieron a inmunodetección con el

anticuerpo específico para H3Ser10ph (Figura 26 A, B;). El efecto inhibitor solo se observó de forma significativa tras 72 horas de tratamiento, tiempo al que se produjo un aumento significativo de un 20% y un 10% en los niveles de expresión de core y NS5A, respectivamente.



**Figura 26. Dinámica del establecimiento de marcas epigenéticas tras la infección por el VHC.**

(A) Inmunodetección específica de core, NS5A y H3Ser10ph en células HuH7.5 infectadas con el VHC de diferentes *fitness* replicativos tras 24, 48 y 72 horas de infección. Como control de carga se utilizó la  $\beta$ -actina. Los niveles de H3Ser10ph (B), NS5A (C) y core (D) fueron cuantificados por densitometría y representados como veces de inducción con respecto a las células sin infectar a partir de dos experimentos diferentes. La significación de los datos se muestra con \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  y \*\*\*  $p < 0.001$ . Las barras se muestran en distintas tonalidades de verde según el pase viral.



El laboratorio del Dr. Esteban Domingo y la Dra. Celia Perales había generado cepas de virus con mayor *fitness*, VHC-p100 y VHC-p200 [12], por lo que se planteó un proyecto en colaboración con objeto de analizar si virus con una capacidad replicativa mayor generaban los mismos cambios epigenéticos, así como analizar si la cinética de este efecto era similar a la observada en el caso del VHC-p0, de menor *fitness*, utilizado hasta el momento en toda la experimentación previa de esta tesis. Como se puede observar tan solo a las 72 horas post-infección, independientemente del *fitness* viral, la infección por VHC provocó una disminución significativa de los niveles de H3Ser10ph (*Figura 26 A, B*), aunque a las 48 horas en las células infectadas con VHC-p200 se observó una ligera tendencia a la disminución en los niveles de la misma. Cabe destacar que el grado de inhibición de la H3Ser10ph aumentó en función del *fitness* viral, es decir, en presencia del VHC-p0 se produjo una disminución del 30%, mientras que con el VHC-p100 la disminución fue de un 60% y con el VHC-p200, de aproximadamente un 75%.

Respecto a la expresión de las proteínas virales, los niveles de la fosfoproteína NS5A aumentaron en función del *fitness* viral como se observa en la figura 26 C, al igual que en el caso de la proteína core (*Figura 26 D*).

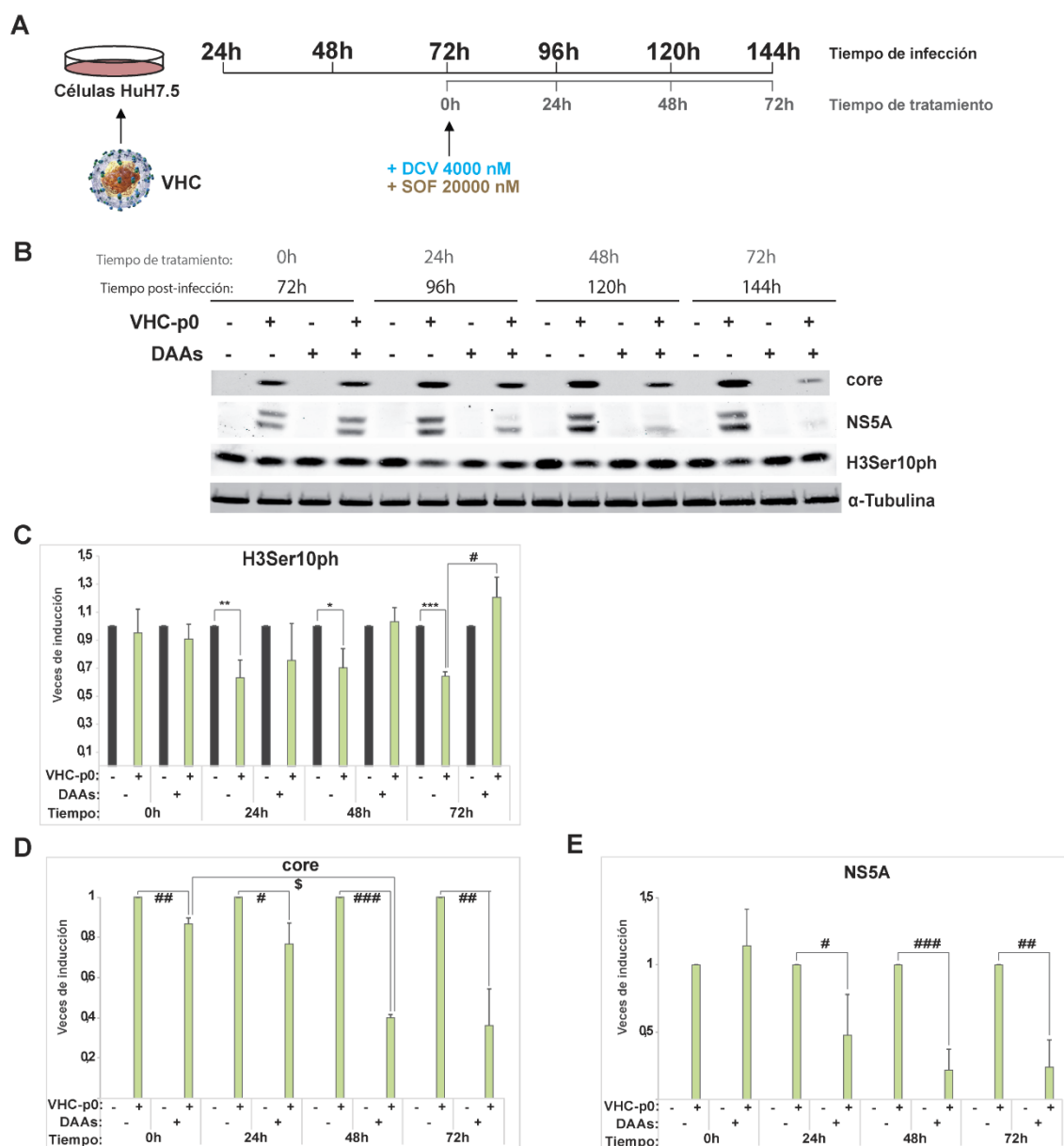
## **2.2. ANÁLISIS DE LA DINÁMICA DE LAS MARCAS EPIGENÉTICAS TRAS EL TRATAMIENTO CON DAAs**

A continuación, quisimos analizar el efecto del tratamiento con DAAs sobre los niveles de H3Ser10ph. Para ello se utilizó una combinación de dos antivirales: 4.000 nM de DCV y 20.000 nM de SOF, dosis capaces de extinguir la replicación del VHC-p200 sin producir toxicidad celular. Las concentraciones escogidas de DCV y SOF son 8.000 y 25 veces mayores, respectivamente, que la concentración necesaria para extinguir el virus parental VHC-p0, dosis previamente establecida en otros trabajos [103, 104].

Las células HuH7.5 se infectaron con el VHC-p0 y fueron tratadas con la combinación de DCV y SOF durante 72 horas. Se recogieron las células a las 72, 96, 120 y 144 horas post-infección o lo que es lo mismo, a 0, 24, 48 y 72 horas después de la adición del tratamiento (*Figura 27 A*).

Como se puede observar en la figura 27 B y C, la disminución en los niveles de H3Ser10ph provocada como consecuencia de la infección viral se revertía completamente a partir de las 48 horas de tratamiento con DAAs, aunque los datos no fueron significativos hasta las 72 horas de tratamiento. Cabe destacar que a las 72 horas de tratamiento los niveles de H3Ser10ph

tienden a aumentar por encima de los niveles basales. Como control del experimento analizamos por Western blot el perfil de NS5A y core (Figura 27 D, E), en presencia y ausencia de virus y tratamiento antiviral, observando como en presencia del tratamiento con DAAs, se producía una disminución paulatina de la expresión de ambas proteínas con respecto a las células infectadas y sin tratamiento. A pesar de las elevadas dosis de DAAs y, tras 72 horas de tratamiento, aún se observaban niveles apreciables de la proteína core.

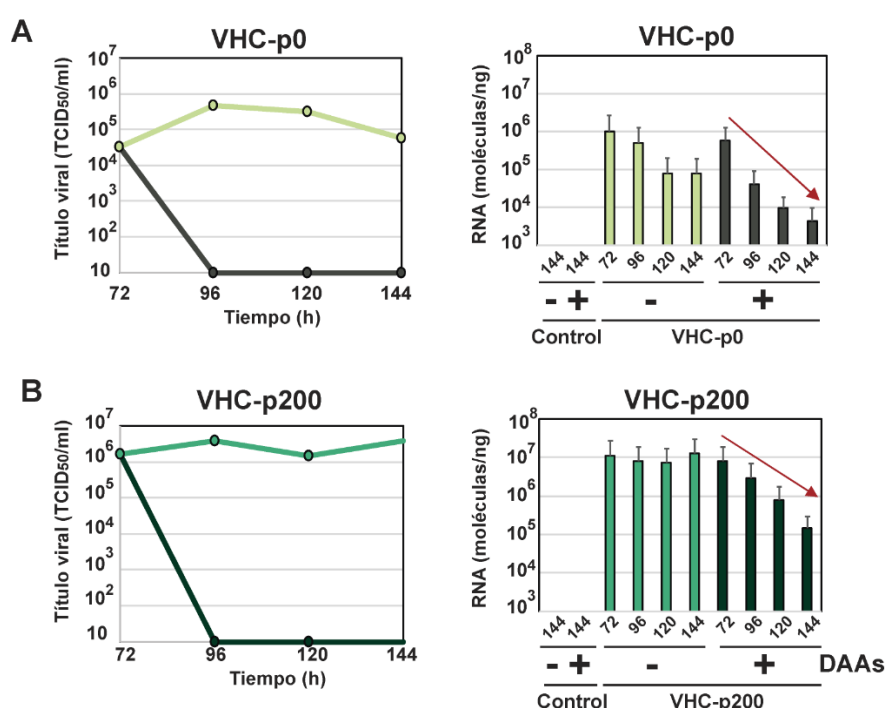


**Figura 27. Efecto de la infección por VHC-p0 y el tratamiento con DAAs en marcas epigenéticas.**

(A) Esquema del experimento realizado: las células HuH7.5 reporter fueron infectadas con el virus VHC-p0; tras 72 horas de infección la mitad de ellas fueron tratadas con la combinación de DAAs (DCV 4000 nM + SOF 20000 nM) y la otra mitad no. Los extractos se recogieron a 72, 96, 120 y 144 horas post-infección (0, 24, 48 y 72 horas de tratamiento con DAAs). Células HuH7.5 reporter sin infectar se utilizaron como control negativo (n=3). (B) Ensayos de western blot utilizando anticuerpos específicos contra H3Ser10ph, core y NS5A. (C) Las gráficas muestran la cuantificación de los niveles de expresión de H3Ser10ph respecto a su basal sin infectar con y sin tratamiento (C) y de las proteínas virales core (D)

y NS5A (E) respecto a su control sin tratamiento. Las células control sin infectar están representadas en color negro y las células infectadas en color verde. Los datos se representan en veces de inducción con respecto a las células no infectadas para cada condición. El símbolo \* muestra las diferencias entre células infectadas y no infectadas, # entre células sin tratar y células tratadas con DAAs y \$ entre los diferentes tiempos. \*, # y \$ representan  $p < 0.05$ , \*\*, ## y \$\$  $p < 0.01$  y \*\*\* y ###  $p < 0.001$ . Los experimentos fueron repetidos entre 2 y 3 veces.

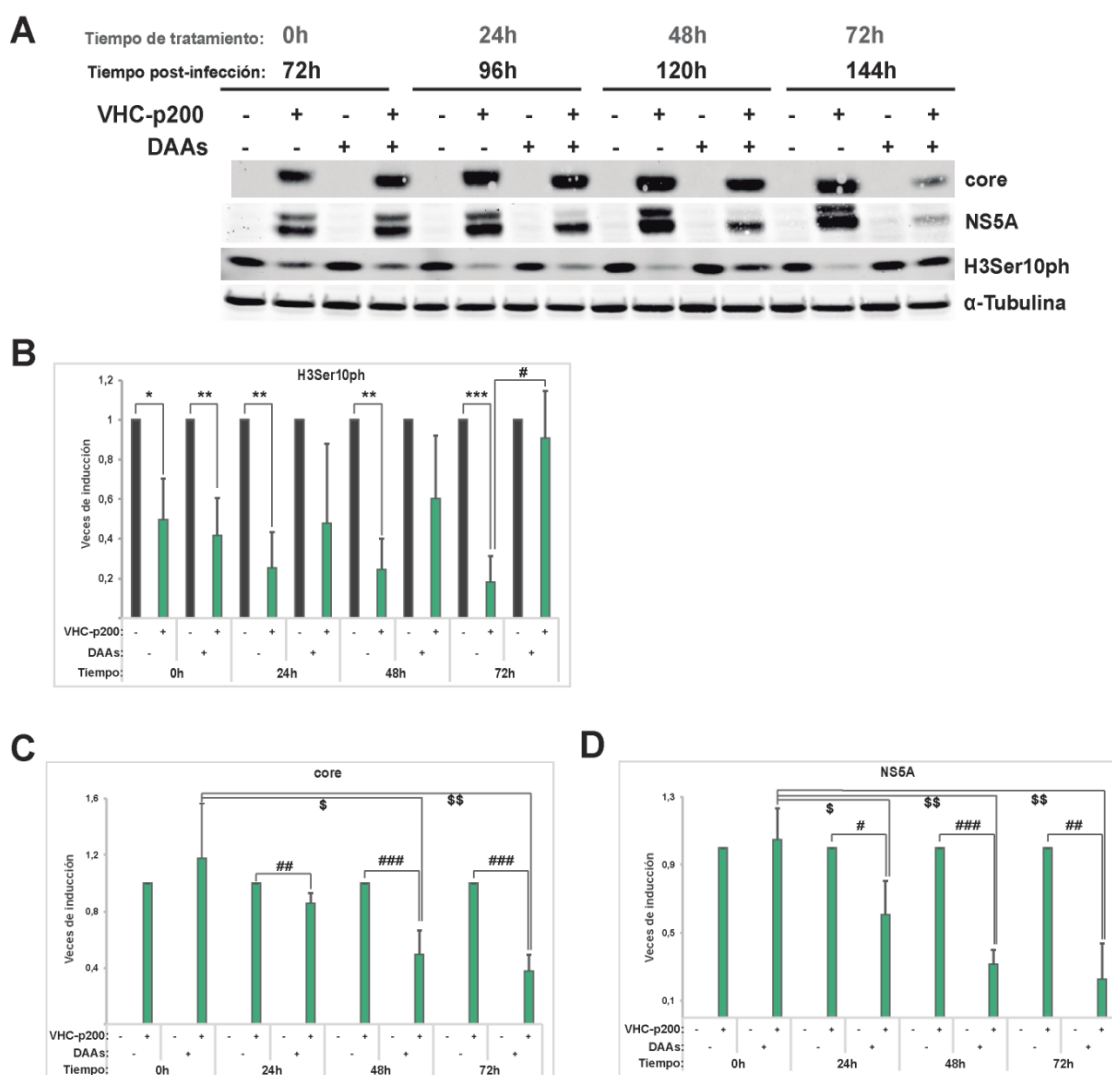
Por ello, se determinó el título viral de los sobrenadantes y el RNA intracelular de las células infectadas con el VHC-p0 (Figura 28 A) y con el VHC-p200 (Figura 28 B). Observándose que, 24 horas tras la adición del tratamiento, el título viral era indetectable. Sin embargo, aunque el RNA intracelular disminuía de forma notable, seguía habiendo moléculas de RNA residual a las 72 horas después del tratamiento con los DAAs.



**Figura 28. Análisis del título viral y del RNA intracelular en células infectadas por los virus VHC-p0 y VHC-p200 y tratadas con DAAs** (Resultados y gráficas originales de la Dra. Celia Perales). Determinación de título viral (TCID50/ml) (izquierda) y de la cantidad de RNA intracelular (moléculas/ng) (derecha) de células infectadas por los virus VHC-P0 (A) y VHC-P200 (B) a los tiempos de infección indicados. En verde se muestran las células sin tratamiento, mientras que en negro se muestran aquellas a las que se les suministró la combinación de DAAs.

En paralelo se realizó un experimento similar al experimento de la figura 27 pero utilizando el virus de alto *fitness*, VHC-p200. En este caso, la disminución de la H3Ser10ph se revirtió completamente y de forma significativa a las 72 horas de tratamiento (Figura 29 A, B); mientras que a las 48 horas no se observó ningún efecto como parecía ocurrir en el caso del VHC-p0 (Figura 27 B, C). Cuando analizamos los niveles de expresión de core y NS5A, observamos como la expresión de ambas proteínas disminuía con el tratamiento, sin embargo,

continuaban expresándose a las 72 horas de tratamiento (*Figura 29 C, D*). Estos datos se correlacionaban con los datos de expresión de RNA intracelular observados en la figura 28 B.



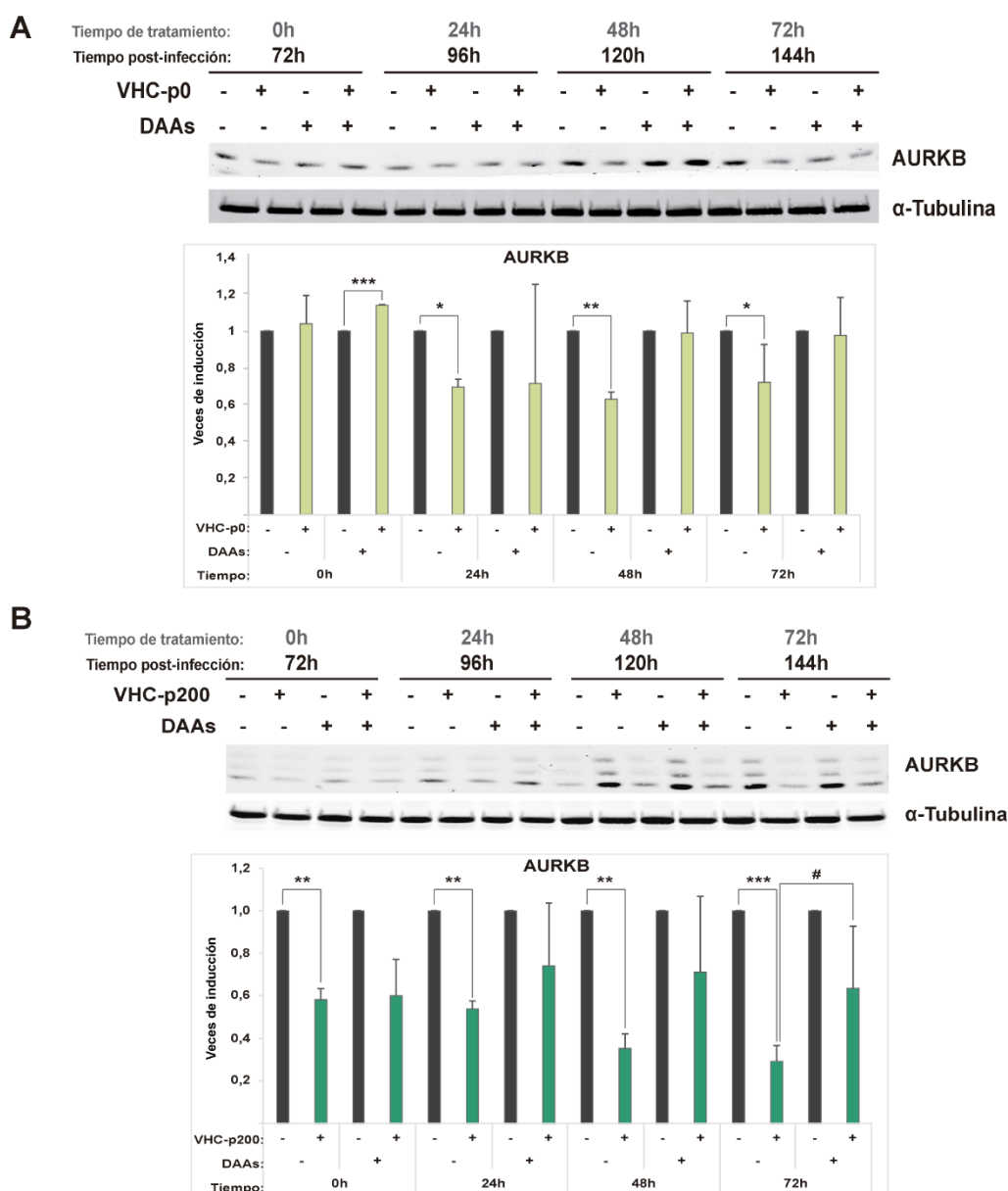
**Figura 29. Efecto de la infección por VHC-p200 y el tratamiento con DAAs en marcas epigenéticas.**

(A) Ensayos de western blot a partir de células HuH7.5 infectadas con VHC-p200 tratadas 72 horas post-infección. (B) Las gráficas muestran la cuantificación por densitometría de los niveles de H3Ser10ph respecto a células sin infectar con y sin tratamiento a diferentes tiempos (0, 24, 48 y 72 horas post-tratamiento) y de las proteínas virales core (C) y NS5A (D) respecto su control sin tratamiento. Las células control sin infectar están representadas en color negro y las células infectadas en color verde. Los datos se representan en veces de inducción con respecto a las células no infectadas para cada condición. El símbolo \* se corresponde con las diferencias entre células infectadas y no infectadas, # entre células sin tratar y células tratadas con DAAs y \$ entre los diferentes tiempos. \*, # y \$ representan  $p < 0.05$ , \*\*, ## y \$\$  $p < 0.01$  y \*\*\* y ###  $p < 0.001$ . Los experimentos fueron repetidos entre 2 y 3 veces.

### **2.3. ANÁLISIS DEL EFECTO DE LA INFECCIÓN POR EL VHC Y DEL TRATAMIENTO CON DAAs SOBRE LA EXPRESIÓN Y ACTIVIDAD DE LA AURKB**

A la vista de los resultados anteriores, analizamos mediante ensayos de western blot la expresión de AURKB. 72 horas después de la infección (tiempo 0 de tratamiento), los niveles de AURKB no variaban con respecto a los niveles observados en células sin infectar, tal y como

habíamos visto en la figura 15 B. Sin embargo, a partir de 96 horas post-infección, observamos como la AURKB disminuía sus niveles de expresión en aproximadamente un 30% por la infección con VHC-p0 (Figura 30 A). Por otro lado, el tratamiento con DAAs produjo cierta reversión de los niveles de AURKB a partir de las 48 horas de su administración (120 horas post-infección), al igual que ocurría con los niveles de H3Ser10ph (Figura 27 B,C), aunque los datos tampoco fueron significativos.



**Figura 30. Efecto de la infección por el VHC y el tratamiento con DAAs en la AURKB.**

Ensayos de western blot a partir de células HuH7.5 infectadas con VHC-p0 (A) y VHC-p200 (B). El tratamiento fue añadido a las 72 horas post-infección. Las gráficas muestran la cuantificación de los niveles de la proteína AURKB respecto a su basal sin infectar con y sin tratamiento a diferentes tiempos: 0, 24, 48 y 72 horas tras el tratamiento con DAAs. Las células control sin infectar están representadas en color negro y las células infectadas en color verde. Los datos se representan en veces de inducción con respecto a las células no infectadas. El símbolo \* se corresponde con las diferencias entre células infectadas y no infectadas, donde \* representan  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  y \*\*\*  $p < 0.001$ . Los experimentos fueron repetidos entre 2 y 3 veces.

Repetimos este experimento con el virus de alto *fitness* VHC-p200 (Figura 30 B) observando que, a diferencia de lo que ocurría con el virus VHC-p0, tras 72 horas de infección (tiempo 0 de tratamiento), se observaba ya una disminución significativa de alrededor de un 42% en los niveles de expresión de AURKB. Esta disminución fue aún mayor a las 120 y 144 horas post-infección, alcanzándose valores de alrededor de un 62% de inhibición. El tratamiento con DAAs produjo una reversión significativa de la inhibición de los niveles de AURKB producidos por el VHC-p200.

### **2.4. EFECTO DEL *FITNESS* VIRAL EN LAS MARCAS EPIGENÉTICAS**

Ya que los efectos de la infección sobre los niveles de AURKB habían sido observados de manera más notable a las 144 horas post-infección, realizamos experimentos adicionales para determinar si el *fitness* viral era relevante sobre la dinámica de las marcas epigenéticas.

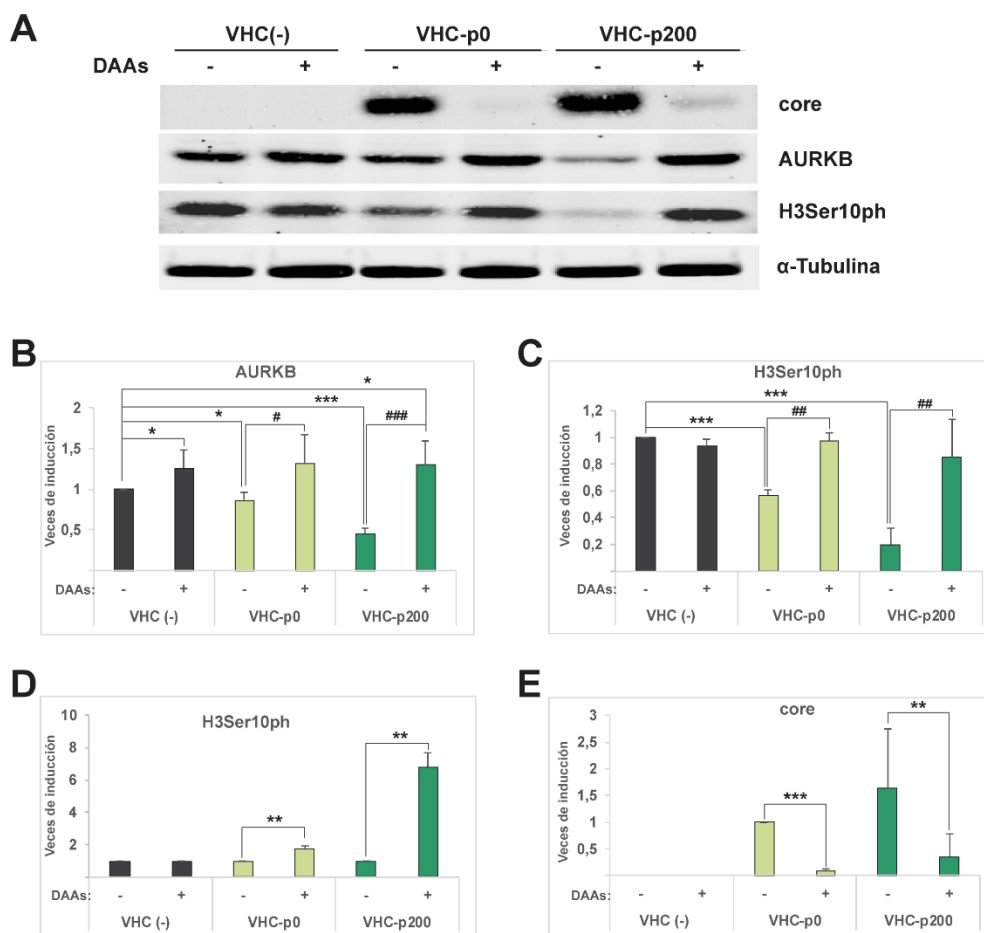
Por ello comparamos mediante western blot los niveles de AURKB en células infectadas con VHC-p0 y VHC-p200 durante 144 horas en ausencia y presencia de tratamiento con DAAs. Como control se utilizaron células HuH7.5 sin infectar. En la figura 31 B se observa como el VHC-p0 provocó una disminución de aproximadamente el 15% en los niveles de AURKB, mientras que el efecto de la infección con el VHC-p200 fue mucho mayor, con una inhibición significativa de alrededor del 62% en los niveles de AURKB.

Los niveles de fosforilación de la H3Ser10 fueron analizados también en paralelo a la AURKB. Como se observa en la figura 31 C, la inhibición de esta marca fue de un 40% tras la infección con VHC-p0, siendo el efecto mayor en el caso de la infección con el virus con mayor *fitness*, VHC-p200, donde la inhibición fue de alrededor de un 80%.

Simultáneamente, analizamos la expresión de la proteína del core, cuyos niveles fueron más elevados para los pases virales con un *fitness* replicativo mayor, coincidiendo con una disminución más acusada de la expresión de la AURKB y de los niveles globales de H3Ser10ph (Figura 31 E). Observamos además como el tratamiento con DAAs producía, en todos los casos, una disminución en los niveles de core, aunque como habíamos observado anteriormente, a las 72 horas de tratamiento se seguían observando niveles significativos de la proteína.

A pesar de ello quisimos analizar si la disminución de la expresión de core en presencia del tratamiento era capaz de revertir los efectos de la infección viral sobre los niveles de AURKB y H3Ser10ph. Sorprendentemente, como se observa en la figura 31 B, el tratamiento con la combinación DCV+SOF inducía un aumento del 25% en los niveles basales de la AURKB

en las células HuH7.5 sin infectar. Por otro lado, en las células infectadas, el tratamiento con DAAs revirtió el efecto de la infección viral, es decir, aumentó los niveles de AURKB, observándose de nuevo como los niveles de la quinasa aumentaban alrededor de un 30% más con respecto a los niveles observados en las células HuH7.5 sin tratamiento, tanto en células infectadas con VHC-p0 como con VHC-p200. En cuanto a la inhibición en la fosforilación del residuo H3Ser10ph, se revirtió completamente en presencia del tratamiento con DAAs. En este caso, los niveles de H3Ser10ph aumentaron hasta los niveles basales observados en células HuH7.5 sin tratar y tratadas con DAAs. Cabe destacar que la reversión que se experimentó en el pase viral VHC-p200 fue mucho mayor, como se puede observar en la figura 31 D, ya que al partir de unos niveles de expresión más reducidos y recuperarse la expresión basal, la capacidad de reversión provocada por el tratamiento es mucho mayor.

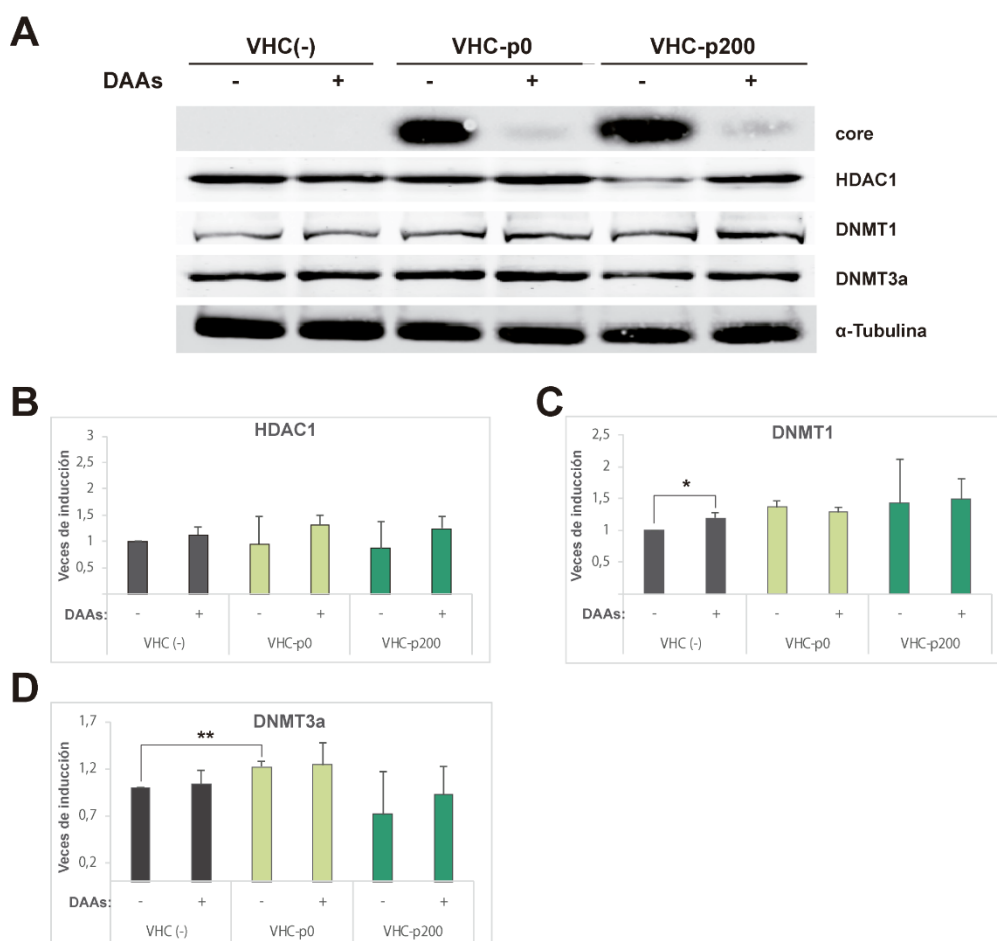


**Figura 31. Efecto del *fitness* vital y el tratamiento con DAAs en la H3Ser10ph y en la AURKB.**

(A) Ensayos de western blot a partir de células HuH7.5 infectadas con VHC-p0 y VHC-p200 144 horas y tratadas durante 72 horas. Se emplearon anticuerpos específicos contra core, AURKB y H3Ser10ph. Como control de carga se utilizó la  $\alpha$ -Tubulina. Los niveles de AURKB (B), H3Ser10ph (C) y core (E) fueron cuantificados y expresados como unidades de inducción respecto a las células control C sin infectar y sin tratamiento. (D) Niveles de H3Ser10ph representados como unidades de inducción respecto al control sin tratamiento para cada una de las condiciones. El símbolo \* se corresponde con  $p < 0.05$ , \*\* y ##  $p < 0.01$  y \*\*\*  $p < 0.001$ . Los experimentos fueron repetidos entre 3 y 4 veces.

## 2.5. ANÁLISIS DEL EFECTO DE LA INFECCIÓN POR EL VHC Y DEL TRATAMIENTO CON DAAs EN LA EXPRESIÓN DE OTRAS PROTEÍNAS IMPLICADAS EN PROCESOS EPIGENÉTICOS

Se ha descrito como la alteración de diferentes actividades enzimáticas relacionadas con procesos epigenéticos tienen implicación en el desarrollo de diferentes tipos de cáncer. De hecho, se ha observado que la expresión de DNMTs y HDACs está aumentada en diversos tipos de tumores, incluido el CHC [105-108]. En este sentido cabe destacar que además el VHC aumenta la expresión de DNMTs y HDACs [109, 110].



**Figura 32. Efecto del *fitness* vital y el tratamiento con DAAs en HDAC1, DNMT1 y DNMT3a.**

(A) Inmunodetección específica de HDAC1, DNMT1 y DNMT3a partir de células HuH7.5 infectadas con VHC-p0 y VHC-p200 durante 144 horas y tratadas con DAAs 72 horas. El ensayo fue realizado con los extractos recogidos 72 horas después de la adición del tratamiento. Los niveles de las diferentes proteínas: HDAC1 (B), DNMT1 (C) y DNMT3a (D) fueron cuantificados y expresados como unidades de inducción respecto a las células control C sin infectar. El símbolo \* se corresponde con  $p < 0.05$ . Los experimentos fueron repetidos entre 2 y 3 veces.

Debido al posible aumento de la incidencia de recidivas de CHC descrita en algunos pacientes tratados con estos fármacos [111], nos planteamos si los tratamientos antivirales alteraban los niveles de estas actividades enzimáticas. Analizamos la expresión de HDAC1,



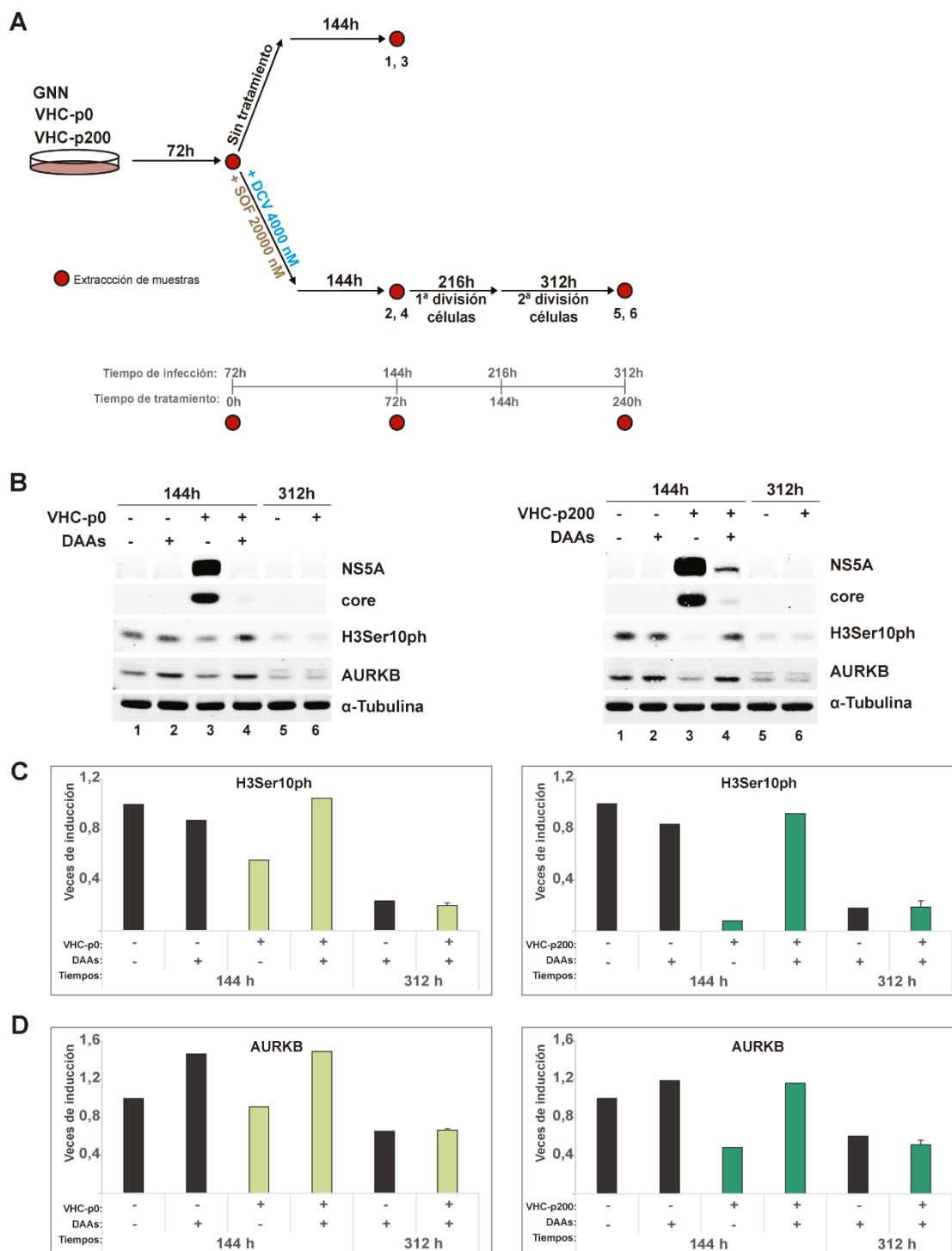
DNMT1 y 3a en presencia y ausencia del tratamiento en células infectadas con VHC. Como control del experimento se utilizaron células sin infectar y en ausencia de tratamiento. Como se observa en la figura 32 A, la infección por el VHC-p0 no produjo ningún efecto significativo sobre los niveles basales de HDAC1 (*Figura 32 B*). Respecto a la DNMT1, se observó una tendencia al aumento en presencia del VHC (*Figura 32 C*) al igual que en el caso de la DNMT3a (*Figura 32 D*), dicho aumento de alrededor del 21% fue solo significativo en el caso del VHC-p0. En cuanto al efecto de los DAAs sobre los niveles de expresión de estas actividades enzimáticas, observamos que el tratamiento en ausencia del virus producía un cierto aumento en el caso de HDAC1 (*Figura 32 B*), y un aumento significativo del 20% en DNMT1 (*Figura 32 C*).

En el caso del virus de alto *fitness* (VHC-p200) observamos una tendencia a disminuir los niveles de HDAC1 y DNMT3a como se observa en las figuras 32 B y D respectivamente, y a aumentar los niveles de DNMT1 (*Figura 32 C*), aunque los datos no fueron significativos.

## **2.6. ANÁLISIS DEL RNA VIRAL INTRACELULAR RESIDUAL**

En nuestro sistema celular, el tratamiento con la combinación de DAAs eliminaba el virus a nivel de título viral, es decir, las partículas infectivas liberadas por las células. Este título se determinó a partir de los sobrenadantes recogidos en los experimentos. Sin embargo, habíamos observado como el RNA intracelular viral residual y las proteínas virales no desaparecían completamente a las 72 horas post-tratamiento (144h post-infección).

Con el fin de determinar la estabilidad de este RNA intracelular o su potencial para generar nuevas proteínas virales o reactivar la infección, se llevó a cabo otro experimento en el cual las células infectadas con los virus VHC-p0 y VHC-p200 fueron sometidas a dos divisiones sucesivas. En primer lugar, 72 horas después de la infección, se les añadió la combinación de DAAs a la mitad de ellas. Después del tratamiento fueron sometidas a dos divisiones sucesivas: 72 y 144 horas post-tratamiento (144 y 216 horas post-infección respectivamente) sin administrar el tratamiento de nuevo. La extracción de muestras y determinación del RNA intracelular viral se realizó en la primera división, es decir 144 horas post-infección, y 96 horas después de la segunda división celular (312 horas post-infección) (*Figura 33 A*). Tras la segunda división (312 horas) no se obtuvieron valores de RNA intracelular viral, indicando que el RNA intracelular remanente se trata de un RNA residual, que carece de capacidad infectiva y se pierde después de dos divisiones celulares sucesivas sin ser necesaria una nueva adición de la combinación de DAAs.



**Figura 33. Eliminación del RNA viral residual y de la expresión de NS5A y core en células tratadas.**

(A) Esquema del experimento: las células HuH7.5 fueron infectadas con VHC-p0 y VHC-p200, 72 horas después fueron tratadas con la combinación de DAAs. A continuación, se sometieron a dos divisiones sucesivas 72 horas después del tratamiento y 144 horas después. Los extractos de RNA extracelular, RNA intracelular y proteína, y la determinación del título viral se llevaron a cabo en los tiempos indicados en la imagen (punto rojo). (B) Los niveles de expresión de las proteínas virales NS5A y core, de H3Ser10ph y AURKB fueron analizados mediante ensayos de western blot. Como control de carga se utilizó la α-Tubulina. Los niveles de expresión de la H3Ser10ph (C) y de AURKB (D) fueron cuantificados mediante densitometría y representados como veces de inducción respecto al control de células sin infectar y sin tratar con DAAs por 144 horas para cada uno de los virus.

Además, se recogieron extractos proteicos a 144 y 312 horas, procedentes de las células infectadas por los virus VHC-p0 y -p200 tratadas que habían sido divididas en dos ocasiones sucesivas para determinar, a nivel de proteína, si también se conseguía anular completamente la expresión de las proteínas NS5A y core. Como previamente habíamos descrito (*Figuras 27 D, E y 30 C, D*), a las 144 horas todavía había expresión de ambas proteínas virales y, en ausencia de tratamiento se observaba una importante disminución de los niveles de H3Ser10ph, efecto que se revierte en presencia de los DAAs. Sin embargo, tras la segunda división (312 horas), las células perdían completamente la expresión de NS5A y core (*Figura 33 B*), en concordancia con los resultados obtenidos para el RNA intracelular viral. En cuanto a los niveles de H3Ser10ph, fueron inferiores a los observados en las células control sin infectar a 144 horas, coincidiendo con una disminución en los niveles de AURKB (*Figura 33 B, C, D*).

### **3. ANÁLISIS DE LA CORRELACIÓN DE LOS POLIMORFISMOS DE AURKB CON LA PROGRESIÓN DE LA ENFERMEDAD HEPÁTICA EN PACIENTES CON HEPATITIS C CRÓNICA**

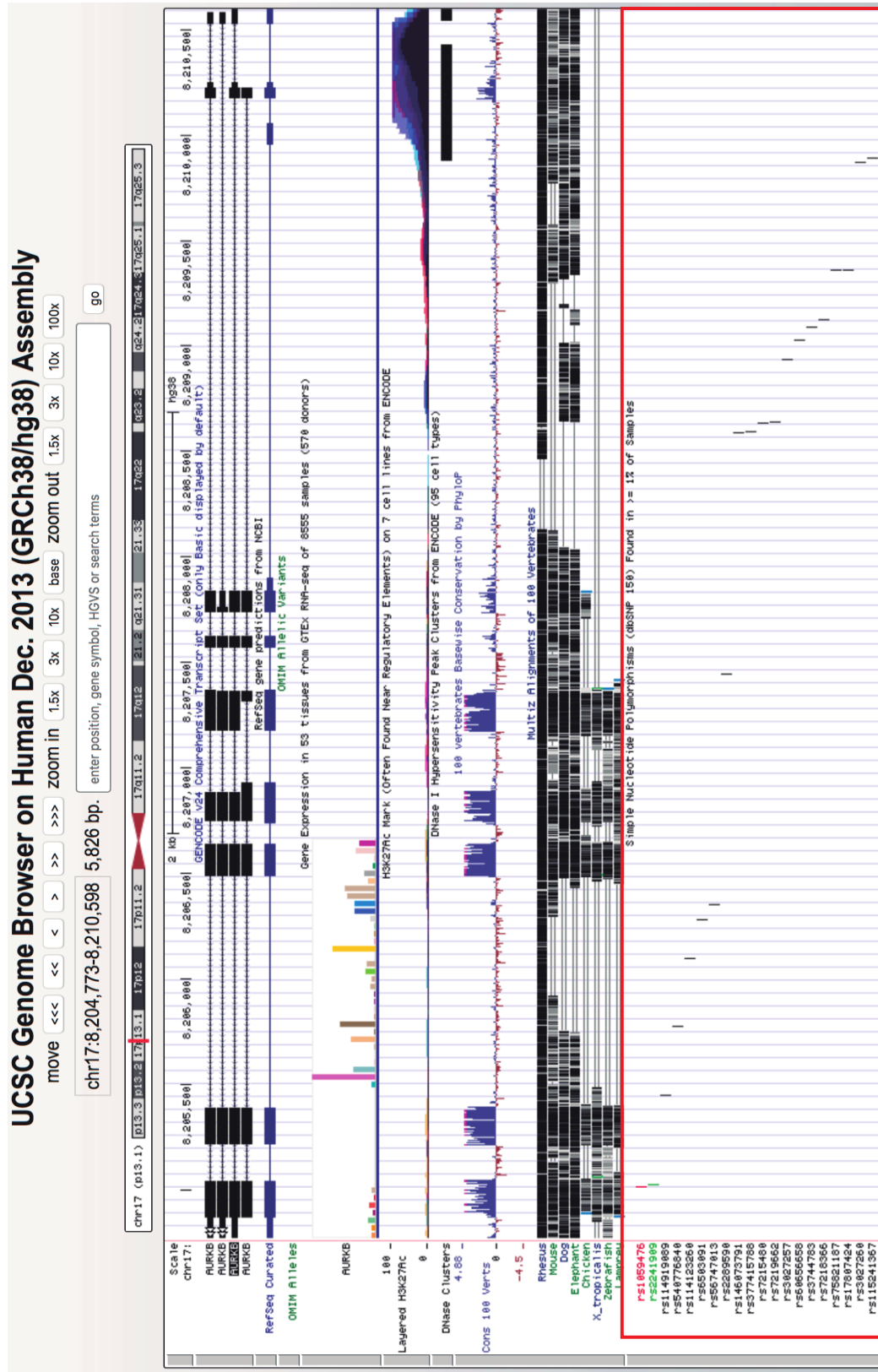
#### **3.1. ANÁLISIS DEL GEN *AURKB***

Los resultados obtenidos en los ensayos *in vitro* con líneas celulares de hepatoma demostraban que la AURKB regulaba la infectividad del VHC y la expresión de genes de la ruta inflamatoria a través de una interacción directa con la proteína core, ambos factores esenciales en la progresión de la fibrosis hepática en pacientes con hepatitis crónica C. Dado que este tipo de interacciones son susceptibles de verse modificadas por cambios en los niveles de expresión y secuencias de las mismas, se procedió a analizar si las diferentes variantes polimórficas de AURKB podrían asociarse a diferentes patrones de evolución de la fibrosis hepática en pacientes con hepatitis crónica C.

#### Contexto génico:

El gen que codifica para la proteína quinasa Aurora B se encuentra localizado en el cromosoma 17, entre las posiciones: 8.204.773 y 8.210.598, según el Genome Reference Consortium Human Build 38 (GRCh38/hg38) [112]. La *AURKB* está codificada en la cadena *antisense* y su secuencia está bastante conservada en mamíferos [113].

A



B

| NOMBRE    | ID TRÁNSCRITO      | NUCLEÓTIDOS | PROTEÍNA | BIOTIPO                            | OTROS             |
|-----------|--------------------|-------------|----------|------------------------------------|-------------------|
| AURKB-201 | ENST00000316199.10 | 1254 pb     | 345 aa   | Proteína codificante               | -                 |
| AURKB-214 | ENST00000585124.5  | 1227pb      | 344 aa   | Proteína codificante               | -                 |
| AURKB-202 | ENST00000534871.5  | 1167 pb     | 303 aa   | Proteína codificante               | -                 |
| AURKB-204 | ENST00000578541.5  | 939 pb      | 312 aa   | Proteína codificante               | -                 |
| AURKB-203 | ENST00000577833.5  | 867 pb      | 230 aa   | Proteína codificante               | CDS 3' incompleto |
| AURKB-209 | ENST00000582368.5  | 771 pb      | 172 aa   | Proteína codificante               | CDS 3' incompleto |
| AURKB-208 | ENST00000581511.5  | 742 pb      | 228 aa   | Proteína codificante               | CDS 3' incompleto |
| AURKB-213 | ENST00000584972.5  | 739 pb      | 242 aa   | Proteína codificante               | CDS 3' incompleto |
| AURKB-211 | ENST00000583915.1  | 397 pb      | 69 aa    | Proteína codificante               | CDS 3' incompleto |
| AURKB-207 | ENST00000580998.5  | 746 pb      | 123 aa   | Degradación mRNA por mutación STOP | -                 |
| AURKB-212 | ENST00000584561.1  | 1010 pb     | -        | Retención de un intrón             | -                 |
| AURKB-206 | ENST00000580390.5  | 740 pb      | -        | Retención de un intrón             | -                 |
| AURKB-205 | ENST00000578753.1  | 467 pb      | -        | Retención de un intrón             | -                 |
| AURKB-210 | ENST00000583124.1  | 323 pb      | -        | Retención de un intrón             | -                 |

**Figura 34. Análisis *in silico* del gen de la AURKB.**

(A) Imagen del UCSC Genome Browser. Representación gráfica del gen *AURKB*, incluyendo datos de localización y dirección de la codificación, datos de expresión en tejidos, niveles de transcripción, elementos de regulación de la expresión (niveles de H3K27Ac relacionados con activación de la expresión, ensayos DNaseI hypersensitivity para determinar la apertura del DNA a nivel de promotor), genómica comparativa (conservación del genoma en diferentes especies) y datos de variabilidad (SNPs). (B) Tabla de transcritos predictivos del gen de la AURKB en homo sapiens procedente de la base de datos Ensembl Genome Browser.

#### Variantes transcripcionales:

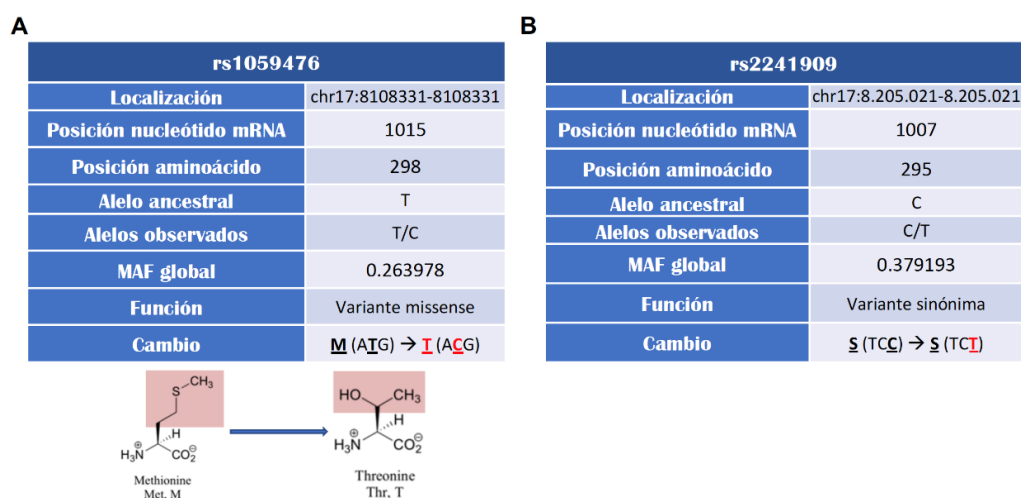
El gen *AURKB* codifica para 14 transcritos predictivos diferentes (variantes de splicing) que pueden observarse en la figura 34 B [114]. Los transcritos difieren en tamaño en función del splicing alternativo que lleven a cabo. Algunos de ellos presentan mutaciones *nonsense*, que generan un codón de terminación y, como consecuencia, genera formas truncadas y/o no funcionales; en otros se retiene un intrón resultando en una proteína truncada, ya que genera un mensajero con demasiada longitud que puede tener un codón de terminación o un cambio en el marco de lectura; finalmente otros tienen la secuencia codificante 3' o 5' incompleta, por lo que la proteína que codifican no se traduce correctamente. Como consecuencia, tan solo 4 variantes transcripcionales generan proteínas funcionales, las denominadas como AURKB-201, -214, -202, -204).

#### **3.1.1. SELECCIÓN DE SNPs PARA ANÁLISIS**

Una vez identificadas las 4 variantes transcripcionales de interés, se procedió a realizar un ratreo de SNPs con potencial interés clínico en el gen de la AURKB. Dado que se han descrito numerosos polimorfismos presentes a lo largo de la secuencia génica del gen de la *AURKB*, tanto regiones intrónicas como exónicas (*Figura 34 A, recuadro rojo*), se centró el análisis en los SNPs que cumplieran los siguientes requisitos:

- 1) SNPs de los que exista evidencia previa de correlación con desarrollo neoplásico o con procesos de inflamación o fibrosis, independientemente de que se encuentren en zonas codificantes o reguladoras del gen o de que produzcan o no cambios en la secuencia de la proteína.
- 2) En el caso de SNPs sin evidencia previa de implicación clínica, se seleccionarán aquellos que se encuentren en la región codificante del gen y generen mutaciones no sinónimas, con el objeto de analizar si variaciones en la estructura de la proteína tiene algún efecto en las interacciones con la proteína del core viral.
- 3) Se seleccionarán preferentemente aquellos SNPs que presenten una frecuencia de su alelo minoritario (MIF) superior al 0.1, con objeto de que sea representativo en la población.

Se utilizaron las bases de datos: Ensembl Genome Browser, dbSNP (NCBI) y USCS Genome Browser para la identificación de variantes alélicas. A través de la herramienta de Biomart, perteneciente a la base de datos de Ensembl, mediante un criterio de selección por filtros, seleccionamos las variantes presentes en regiones exónicas con una MIF>0.1. El sistema nos mostró dos SNPs: rs1059476 y rs2241909, que cumplían los requisitos de selección anteriormente descritos.



**Figura 35. Características de los polimorfismos de AURKB seleccionados: rs1059476 (A) y rs2241909 (B).** En (A) están representadas también las estructuras químicas de los aminoácidos que intervienen en el polimorfismo.

El SNP rs1059476 es una variante no sinónima que se encuentra localizada en la región codificante del gen. El cambio nucleotídico afecta al triplete ATG, correspondiente al aminoácido en posición 298 que codifica para metionina, que pasaría a ser ACG, que codifica para treonina (c.1015T>C a nivel de nucleótido y p.M298T a nivel de proteína), es decir, pasamos de un aminoácido no polar con una cadena lateral alifática con un enlace

tioester a un aminoácido polar con una cadena lateral no cargada, un grupo hidroxilo, que lo hace más hidrofílico y reactivo, y que además genera una nueva posición potencialmente fosforilable (*Figura 35 A*).

En cuanto al SNP rs2241909, está también situado en la región codificante del gen; en este caso se trata de una variante sinónima en la cual, a nivel nucleotídico se produce un cambio de citosina a timina en el nucleótido 1007 (c.1007C>T), en ambos casos, los tripletes resultantes codifican para el aminoácido serina en posición 295; por lo que no tiene consecuencia directa en la proteína (*Figura 35 B*). Sin embargo, analizamos este SNP porque estudios previos habían descrito una asociación significativa entre el polimorfismo rs2241909 con el riesgo de cáncer de mama familiar [68] y con la prognosis de cáncer colorrectal metastásico [84].

### **3.2. ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO DE LOS SNPs DE *AURKB***

Con el objetivo de evaluar si las variantes alélicas del gen *AURKB* en las posiciones analizadas se asocian a cambios funcionales significativos, se procedió a realizar un estudio predictivo de los cambios en las regiones de unión a factores de transcripción entre las diferentes variantes. Para lo cual, llevamos a cabo un análisis *in silico* usando el software PROMO, en el servidor web ALGGENE [86, 98, 99].

El estudio predictivo *in silico* confirmó que las diferentes variantes alélicas de ambas posiciones del gen *AURKB* se asocian a cambios radicales en los motivos de unión a diferentes factores de transcripción (*Tabla 5*). La región que incluye el SNP rs2241909 permite la unión de los factores Pax-1 y p53 cuando el polimorfismo c.1007C>T está presente; en presencia del alelo wt, se reconocen motivos adicionales de unión para los factores STAT4, ETS-1 y ELK-1. En el caso de la región que contiene a rs1059476, en presencia del polimorfismo c.1015T>C no une ningún factor de transcripción, sin embargo, en presencia del alelo T (*wild type*) posee dos dominios de reconocimiento del factor de transcripción YY1.

En ambos casos se confirmó que las formas minoritarias de ambos alelos (coincidentes con las secuencias ancestrales) presentaban una mayor capacidad de unión a factores de transcripción que las formas alélicas mayoritarias. Así, la región que incluye la posición rs2241909 permite la unión de hasta 5 factores de transcripción cuando presenta el alelo minoritario (secuencia ancestral), y se reduce a únicamente dos cuando presenta la variante mayoritaria. De forma similar, la variante mayoritaria de la posición rs1059476 se asocia a la pérdida de dos motivos de unión al factor YY1 presentes en la forma ancestral.

| SNP                       | rs2241909 |       | rs1059476 |   |
|---------------------------|-----------|-------|-----------|---|
| Alelos                    | C         | T     | T         | C |
| Factores de transcripción | PAX-5     | PAX-5 | YY1       |   |
|                           | P53       | P53   | YY1       |   |
|                           | STAT4     |       |           |   |
|                           | ETS-1     |       |           |   |
|                           | ELK-1     |       |           |   |

Tabla 5. Estudio *in silico* de los motivos de unión a factores de transcripción de la secuencia de DNA en función de los distintos alelos de rs2241909 y rs1059476.

### 3.3. AMPLIFICACIÓN DE LA REGIÓN CODIFICANTE DE *AURKB* Y ANÁLISIS DE POLIMORFISMOS

Todos los pacientes analizados (n=348) resultaron positivos a la amplificación del fragmento de 375 pb de la región codificante del gen de la *AURKB* que incluía las posiciones rs1059476 y rs2241909. La composición alélica de cada paciente en dichas posiciones se analizó por secuenciación directa poblacional Sanger. Los resultados de análisis de alelos se confirmaron en 53 pacientes utilizando una técnica alternativa de análisis de secuencia por pirosecuenciación y en 10 por amplificación en sistema RealTime-PCR utilizando sondas de hibridación FRET. La concordancia de resultados en todos los casos analizados confirmó la fiabilidad del sistema de análisis.

Se analizaron un total de 348 pacientes con hepatitis crónica C, agrupados según el grado de fibrosis hepática: 26,7% F0-F1 (93/348); 33,6% F2 (117/348), 15,2% F3 (53/348) and 24,4% F4 (85/348) (*Figura 36 A*). La distribución alélica se comparó entre dos agrupaciones de perfiles de progresión de la enfermedad hepática: pacientes no cirróticos (F0-F3) frente a pacientes cirróticos (F4) y también entre pacientes con un grado de fibrosis bajo a moderado (F0-F2) frente a pacientes con fibrosis elevada (F3-F4).

### 3.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA DISTRIBUCIÓN DE LOS PACIENTES

Dado que el objetivo del análisis de pacientes era determinar la distribución alélica de los pacientes con diferentes grados de fibrosis, se analizó en primer lugar si existían diferencias a las variables demográficas o virológicas que pudieran interferir en el análisis posterior. No se encontraron diferencias significativas en la distribución de los pacientes en función del genotipo viral ni del género. Sin embargo, encontramos diferencias significativas en la



distribución de edades, estando repartidos los pacientes de mayor edad en los grupos de enfermedad hepática con mayor progresión (Figura 38 B).

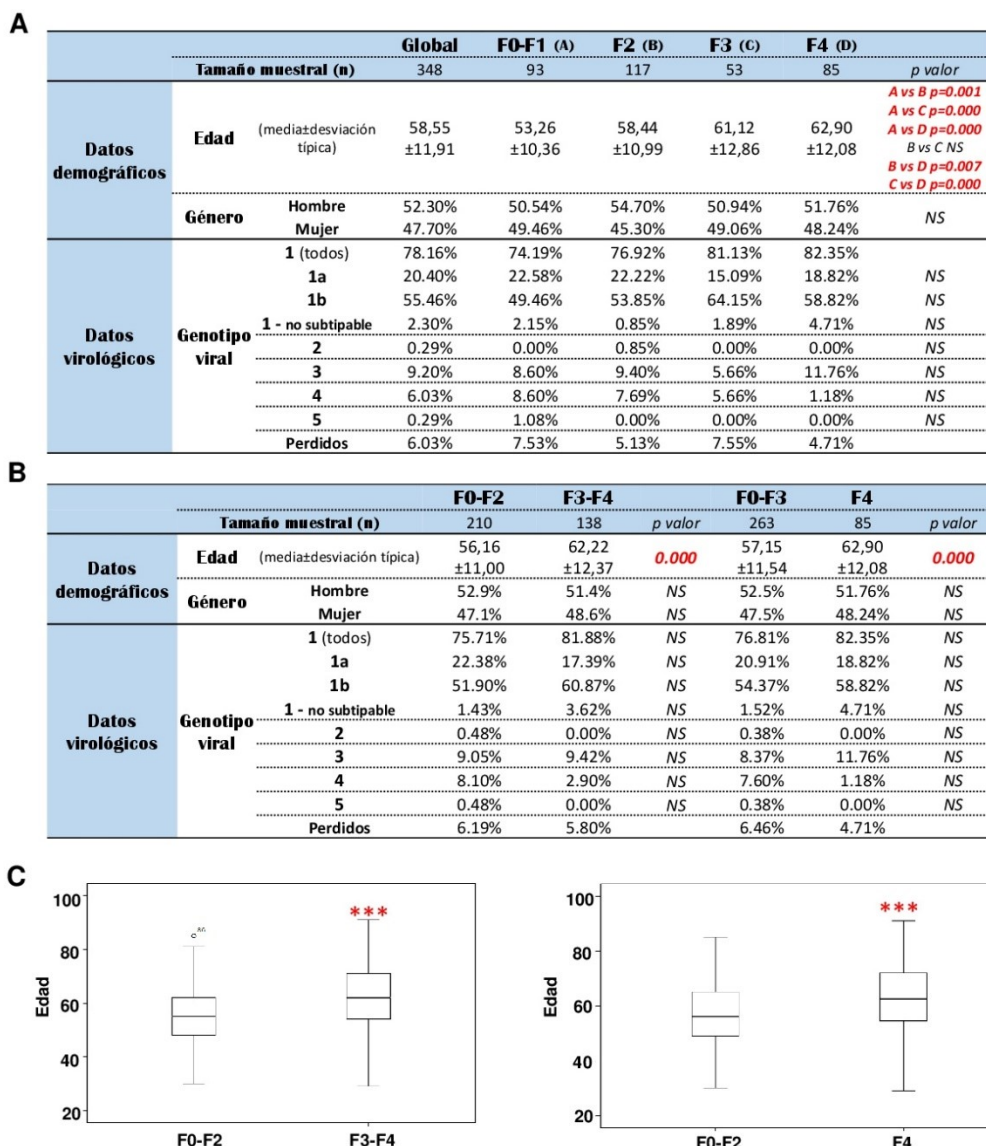


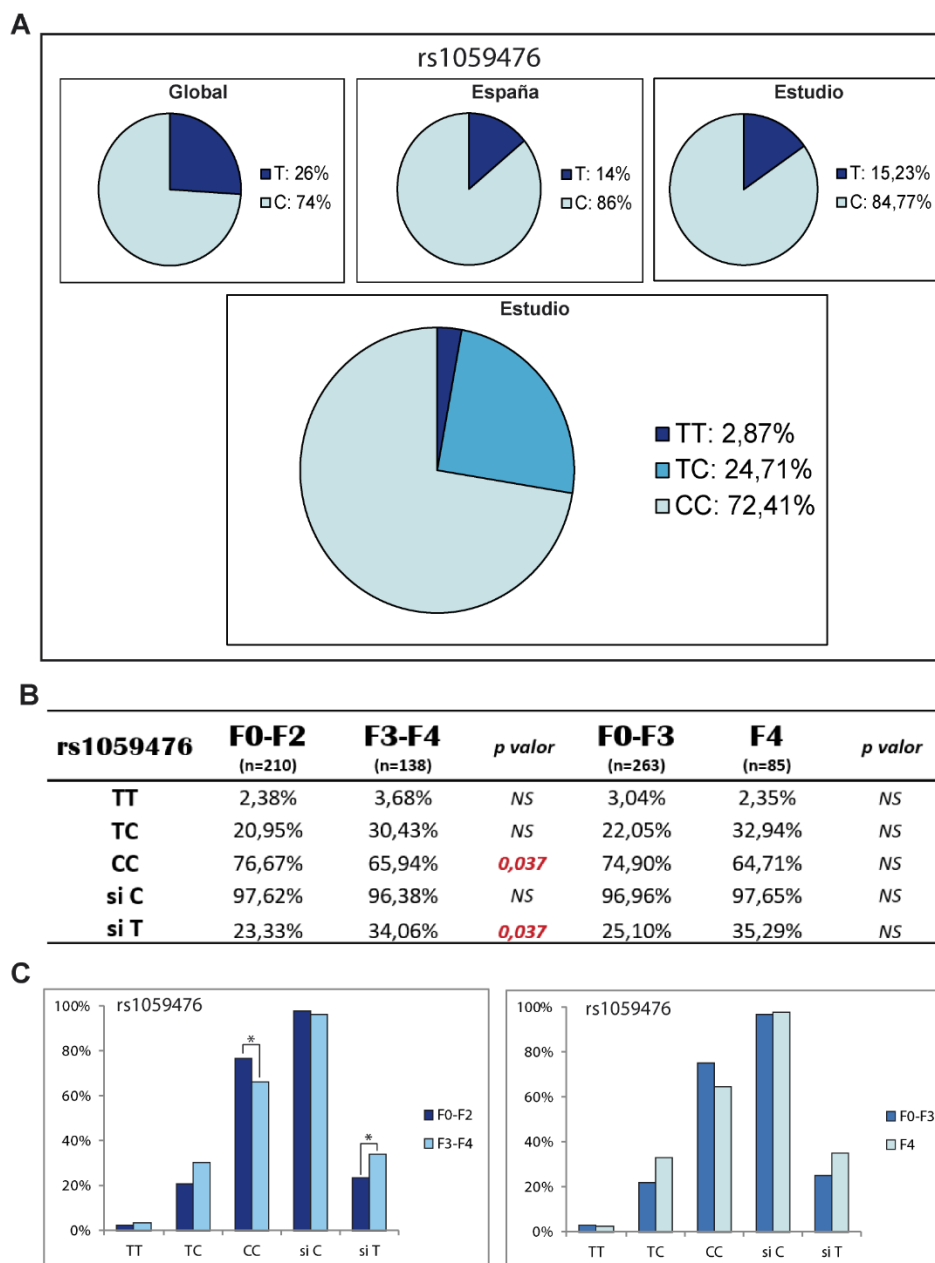
Figura 36. Características demográficas y virológicas de la cohorte de pacientes seleccionados para el estudio de asociación.

(A) Tabla resumen de los datos demográficos (edad y género) y de los datos virológicos referidos al genotipo viral para los diferentes grupos de fibrosis. (B) Análisis estadístico comparativo de la distribución de los datos demográficos y virológicos recogidos de las categorías de comparación de los pacientes (F0-F2 vs F3-F4 y F0-F3 vs F4) que van a someterse a un análisis de asociación. (C) Representación gráfica de la distribución de edades entre las categorías de pacientes del estudio.

### 3.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA DISTRIBUCIÓN DE LOS SNPs SELECCIONADOS

#### 3.5.1. ANÁLISIS GLOBAL DE LA DISTRIBUCIÓN DE LAS FRECUENCIAS ALÉLICAS DE rs1059476

Los datos globales de distribución alélica de la posición rs1059476 recogidos en nuestro estudio se aproximan mucho a los datos de distribución publicados en la base de datos de Ensembl correspondiente a España (Figura 37 A), siendo la prevalencia del alelo T algo mayor en nuestra serie de pacientes. Cabe mencionar que la presencia del alelo T en homocigosis tiene una frecuencia muy baja en la población en general y en nuestra selección de pacientes.



**Figura 37. Análisis de las frecuencias de distribución de rs1059476.**

(A) Representación gráfica de los datos de frecuencia totales de rs1059476. Los datos de distribución globales y de España fueron obtenidos de la base de datos Ensembl genome browser 84 y comparados con los recogidos en nuestra cohorte de pacientes. (B) Tabla de distribución de las frecuencias alélicas del SNP rs1059476 para los diferentes estadios de fibrosis y análisis estadístico mediante la prueba chi-cuadrado para evaluar la asociación de las distintas combinaciones alélicas con el grado de fibrosis. El nivel de significación usado fue  $p < 0.05$ . (C) Tabla

de distribución de las frecuencias alélicas del SNP rs1059476 para las diferentes categorías de pacientes comparadas en el estudio [pacientes con fibrosis leve a moderada (F0-F2) frente a fibrosis elevada (F3-F4) y pacientes no cirróticos (F0-F3) frente a pacientes cirróticos (F4)] y análisis estadístico mediante la prueba chi-cuadrado para evaluar la asociación de las distintas combinaciones alélicas a los grupos de pacientes. El nivel de significancia usado fue  $p < 0.05$ . (D) Representación gráfica de las frecuencias alélicas de rs1059476.

En un análisis global, observamos como el alelo mayoritario C, presente en la mayor parte de la población (homocigotos CC + heterocigotos CT), no muestra diferencias significativas en su distribución entre los grupos a comparar (*Figura 37 B, C*). Sin embargo, cuando miramos la presencia del alelo T (homocigotos TT + heterocigotos CT), correspondiente al alelo minoritario; vemos que su presencia es más elevada en los grupos de pacientes con estadios más avanzados de progresión de la enfermedad, es decir, en pacientes con fibrosis elevada frente a pacientes con fibrosis baja a moderada ( $p = 0,037$ ) y en pacientes cirróticos frente a no cirróticos ( $p = NS$ ).

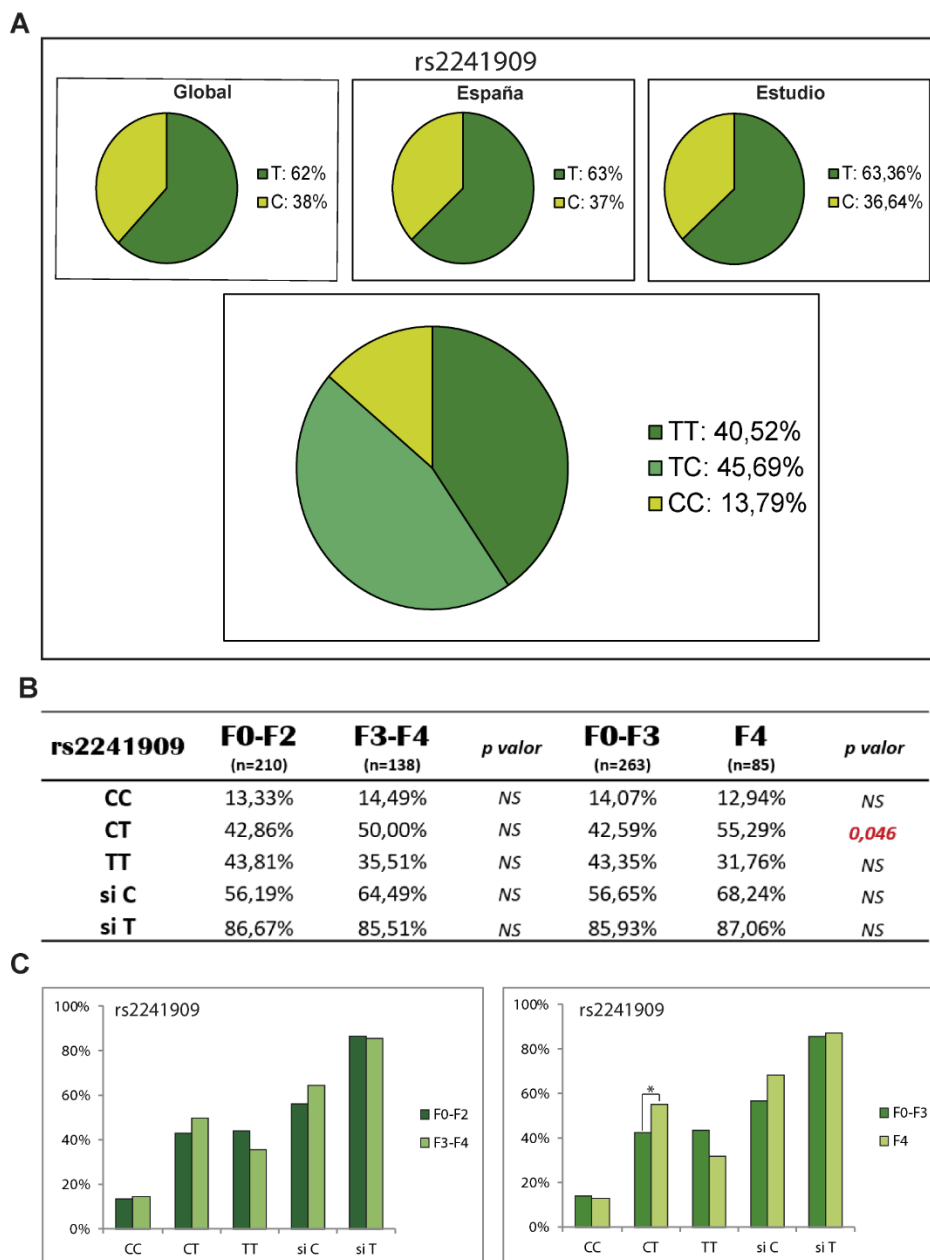
De la misma manera, si analizamos la distribución de cada combinación alélica por separado, la homocigosis en TT presenta una frecuencia muy baja en la población, apenas tiene representación, por lo que no se observan diferencias significativas en su distribución; mientras que, la homocigosis en CC está significativamente más representada en grupos con menos progresión de la enfermedad, es decir, en pacientes con un nivel de fibrosis baja a moderada ( $p = 0,037$ ) y también en pacientes no cirróticos ( $p = NS$ ); mientras que la heterocigosis parece estar asociada en mayor grado a los grupos de pacientes con una progresión mayor de fibrosis: cirrosis o fibrosis elevada.

### **3.5.2. ANÁLISIS GLOBAL DE LA DISTRIBUCIÓN DE LAS FRECUENCIAS ALÉLICAS DE rs2241909**

Los datos globales de distribución recogidos en nuestro estudio coinciden con los datos de distribución que aparecen en la base de datos de Ensembl correspondiente a España (*Figura 38 A*).

En un análisis global, observamos diferencias significativas en la distribución del alelo C (homocigotos CC + heterocigotos CT), alelo minoritario, que está más representado en pacientes cirróticos frente a no cirróticos ( $p = 0,038$ ) (*Figura 38 B, C*). Por otro lado, cuando analizamos la distribución de las diferentes combinaciones alélicas por separado, observamos que la homocigosis TT está significativamente asociada a pacientes cirróticos frente a no cirróticos ( $p = 0,038$ ); mientras que la heterocigosis CT, de nuevo en este SNP está más asociada a pacientes con cirrosis ( $p = 0,028$ ). Cuando analizamos la distribución alélica de rs2241909 en pacientes con fibrosis leve a moderada y en pacientes con fibrosis

elevada, no vimos cambios significativos, aunque se mantuvo la misma tendencia observada en la anterior comparativa.



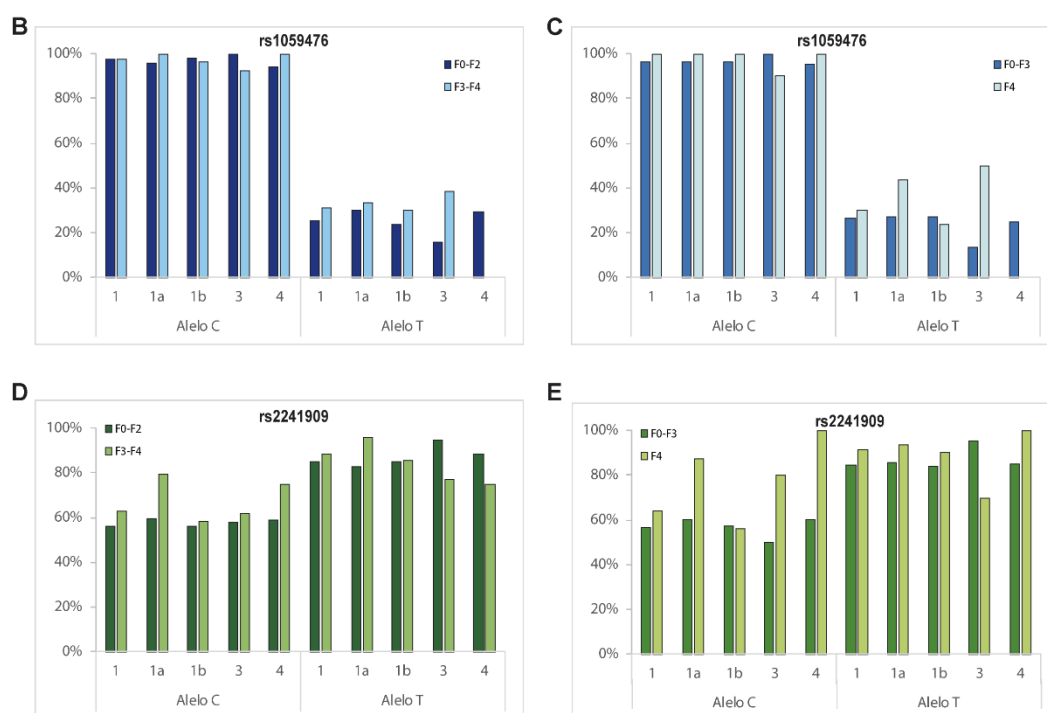
**Figura 38. Análisis de las frecuencias de distribución de rs2241909.**

(A) Representación gráfica de los datos de frecuencia totales de rs2241909. Los datos de distribución globales y de España fueron obtenidos de la base de datos Ensembl genome browser 84 y comparados con los recogidos en nuestra cohorte de pacientes. (B) Tabla de distribución de las frecuencias alélicas del SNP rs2241909 para los diferentes estadios de fibrosis y análisis estadístico mediante la prueba chi-cuadrado para evaluar la asociación de las distintas combinaciones alélicas con el grado de fibrosis. El nivel de significación usado fue  $p < 0.05$ . (C) Tabla de distribución de las frecuencias alélicas del SNP rs2241909 para las diferentes categorías de pacientes comparadas en el estudio [pacientes con fibrosis leve a moderada (F0-F2) frente a fibrosis elevada (F3-F4) y pacientes no cirróticos (F0-F3) frente a pacientes cirróticos (F4)] y análisis estadístico mediante la prueba chi-cuadrado para evaluar la asociación de las distintas combinaciones alélicas a los grupos de pacientes. El nivel de significancia usado fue  $p < 0.05$ . (C) Representación gráfica de las frecuencias alélicas de rs2241909.

## 3.5.3. ANÁLISIS ESTRATIFICADO POR GENOTIPO VIRAL

A

| Genotipo                   | SNP             | F0-F2  | F3-F4  | F0-F3   | F4     |         |
|----------------------------|-----------------|--------|--------|---------|--------|---------|
|                            | Tamaño muestral | n=159  | n=113  | p valor | n=202  | n=70    |
| <b>1</b><br><b>(1a+1b)</b> | TT              | 2.5%   | 2.7%   | NS      | 3.5%   | 0.0%    |
|                            | TC              | 22.6%  | 28.3%  | NS      | 23.3%  | 30.0%   |
|                            | CC              | 74.8%  | 69.0%  | NS      | 73.3%  | 70.0%   |
|                            | si C            | 97.5%  | 97.3%  | NS      | 96.5%  | 100.0%  |
|                            | si T            | 25.2%  | 31.0%  | NS      | 26.7%  | 30.0%   |
|                            | CC              | 15.1%  | 11.5%  | NS      | 15.3%  | 8.6%    |
|                            | CT              | 40.9%  | 51.3%  | NS      | 41.6%  | 55.7%   |
|                            | TT              | 44.0%  | 37.2%  | NS      | 43.1%  | 35.7%   |
|                            | si C            | 56.0%  | 62.8%  | NS      | 56.9%  | 64.3%   |
|                            | si T            | 84.9%  | 88.5%  | NS      | 84.7%  | 91.4%   |
| <b>1a</b>                  | Tamaño muestral | n=47   | n=24   | p valor | n=55   | n=16    |
|                            | TT              | 4.3%   | 0.0%   | NS      | 3.6%   | 0.0%    |
|                            | TC              | 25.5%  | 33.3%  | NS      | 23.6%  | 43.8%   |
|                            | CC              | 70.2%  | 66.7%  | NS      | 72.7%  | 56.3%   |
|                            | si C            | 95.7%  | 100.0% | NS      | 96.4%  | 100.0%  |
|                            | si T            | 29.8%  | 33.3%  | NS      | 27.3%  | 43.8%   |
|                            | CC              | 17.0%  | 4.2%   | NS      | 14.5%  | 6.3%    |
|                            | CT              | 42.6%  | 75.0%  | 0.012   | 45.5%  | 81.3%   |
|                            | TT              | 40.4%  | 20.8%  | NS      | 40.0%  | 12.5%   |
|                            | si C            | 59.6%  | 79.2%  | NS      | 60.0%  | 87.5%   |
| <b>1b</b>                  | si T            | 83.0%  | 95.8%  | NS      | 85.5%  | 93.8%   |
|                            | Tamaño muestral | n=109  | n=84   | p       | n=143  | n=50    |
|                            | TT              | 1.8%   | 3.6%   | NS      | 3.5%   | 0.0%    |
|                            | TC              | 22.0%  | 26.2%  | NS      | 23.8%  | 24.0%   |
|                            | CC              | 76.1%  | 70.2%  | NS      | 72.7%  | 76.0%   |
|                            | si C            | 98.2%  | 96.4%  | NS      | 96.5%  | 100.00% |
|                            | si T            | 23.9%  | 29.8%  | NS      | 27.3%  | 24.0%   |
|                            | CC              | 14.7%  | 14.3%  | NS      | 16.1%  | 10.0%   |
|                            | CT              | 41.3%  | 44.0%  | NS      | 41.3%  | 46.0%   |
|                            | TT              | 44.0%  | 41.7%  | NS      | 42.7%  | 44.0%   |
| <b>3</b>                   | si C            | 56.0%  | 58.3%  | NS      | 57.3%  | 56.0%   |
|                            | si T            | 85.3%  | 85.7%  | NS      | 83.9%  | 90.0%   |
|                            | Tamaño muestral | n=19   | n=13   | p       | n=22   | n=10    |
|                            | TT              | 0.0%   | 7.7%   | NS      | 0.0%   | 10.0%   |
|                            | TC              | 15.8%  | 30.8%  | NS      | 13.6%  | 40.0%   |
|                            | CC              | 84.2%  | 61.5%  | NS      | 86.4%  | 50.0%   |
|                            | si C            | 100.0% | 92.3%  | NS      | 100.0% | 90.0%   |
|                            | si T            | 15.8%  | 38.5%  | NS      | 13.6%  | 50.0%   |
|                            | CC              | 5.3%   | 23.1%  | NS      | 4.5%   | 30.0%   |
|                            | CT              | 52.6%  | 38.5%  | NS      | 45.5%  | 50.0%   |
| <b>4</b>                   | TT              | 42.1%  | 38.5%  | NS      | 50.0%  | 20.0%   |
|                            | si C            | 57.9%  | 61.5%  | NS      | 50.0%  | 80.0%   |
|                            | si T            | 94.7%  | 76.9%  | NS      | 95.5%  | 70.0%   |
|                            | Tamaño muestral | n=17   | n=4    | p       | n=20   | n=1     |
|                            | TT              | 5.9%   | 0.0%   | NS      | 5.0%   | 0.0%    |
|                            | TC              | 23.5%  | 0.0%   | NS      | 20.0%  | 0.0%    |
|                            | CC              | 70.6%  | 100.0% | NS      | 75.0%  | 100.0%  |
|                            | si C            | 94.1%  | 100.0% | NS      | 95.0%  | 100.0%  |
|                            | si T            | 29.4%  | 0.0%   | NS      | 25.0%  | 0.0%    |
|                            | CC              | 11.8%  | 25.0%  | NS      | 15.0%  | 0.0%    |
| <b>rs2241909</b>           | CT              | 47.1%  | 50.0%  | NS      | 45.0%  | 100.0%  |
|                            | TT              | 41.2%  | 25.0%  | NS      | 40.0%  | 0.0%    |
|                            | si C            | 58.8%  | 75.0%  | NS      | 60.0%  | 100.0%  |
|                            | si T            | 88.2%  | 75.0%  | NS      | 85.0%  | 100.0%  |



**Figura 39. Análisis estratificado según el genotipo del VHC de la distribución alélica de rs1059476 y rs2241909**

(A) Tabla de frecuencias de las combinaciones alélicas de rs1059476 y rs2241909 en la población de estudio estratificada en función del genotipo viral para las diferentes categorías de pacientes [pacientes con fibrosis leve a moderada (F0-F2) frente a fibrosis elevada (F3-F4) y pacientes no cirróticos (F0-F3) frente a pacientes cirróticos (F4)] y análisis estadístico comparativo mediante la prueba chi-cuadrado para evaluar la asociación de las distintas combinaciones alélicas a una progresión diferencial de la edad. El nivel de significancia usado fue  $p < 0.05$ . Representación gráfica de las frecuencias alélicas de rs1059476 en pacientes F0-F2 vs F3-F4 (B) y F0-F3 vs F4 (C) y de rs2241909 en pacientes F0-F2 vs F3-F4 (D) y F0-F3 vs F4 (E).

Dado que la interacción directa AURKB/core viral puede verse afectada no solo por variabilidad de la secuencia de AURKB, sino también por la de la proteína del core, se analizó el efecto que el genotipo viral pudiera tener sobre la correlación entre los diferentes alelos y el estadio de fibrosis. Al estratificar los pacientes en base al genotipo viral se confirmó en todos los grupos de pacientes la tendencia observada al analizar la población de forma global, si bien las diferencias estadísticas se perdieron en la mayoría de los grupos al disminuir de forma significativa el tamaño muestral de cada uno de ellos. Únicamente se conserva la significación estadística en la mayor prevalencia de heterocigosis en la posición rs2241909 en pacientes con fibrosis elevada o cirrosis infectados con genotipo 1a (Figura 39). Asimismo, se observó una mayor diferencia en la prevalencia de los alelos T y C de las posiciones rs1059476 y rs2241909, respectivamente, entre pacientes cirróticos y no cirróticos infectados con el subtipo 1a y genotipo 3, que en el resto de genotipos virales, si bien esta tendencia no llegó a la significación estadística.

### **3.5.4. ANÁLISIS ESTRATIFICADO POR GRUPOS DE EDAD**

Dado que la mayoría de los pacientes incluidos presentan periodos de infección muy prolongados, no puede descartarse que la posible correlación entre la composición alélica de la AURKB y la progresión de la fibrosis pueda quedar enmascarada por la progresión a cirrosis debido a periodos de infección prolongados. Para descartar este factor sería necesario analizar la composición alélica de AURKB en relación al tiempo de desarrollo de cirrosis.

Los datos epidemiológicos de los pacientes incluidos en nuestra serie no permitieron determinar de forma clara el momento del inicio de la infección en la mayoría de los casos. Por este motivo, se utilizó un modelo indirecto de análisis, consistente en analizar los pacientes por grupos de edad, suponiendo que las formas avanzadas de fibrosis en grupos de edad menores estarán enriquecidas en pacientes con progresión más rápida de la enfermedad. Para ello, se estratificó la población de pacientes en los siguientes grupos de edad: <55, <60, <65 y <70 años en el momento de diagnóstico de la forma más avanzada de fibrosis hepática durante el seguimiento.

En el caso de rs1059476, volvemos a encontrar esas diferencias significativas en todos los grupos de edad, especialmente cuando enriquecemos la población en pacientes de menor edad, menores de 65 años (<65), mejorando la significancia estadística observada a nivel global (*Figura 40*). Las estadísticas se pierden en grupos de pacientes con edades inferiores a 55 años, ya que tenemos muy pocos pacientes con estas características.

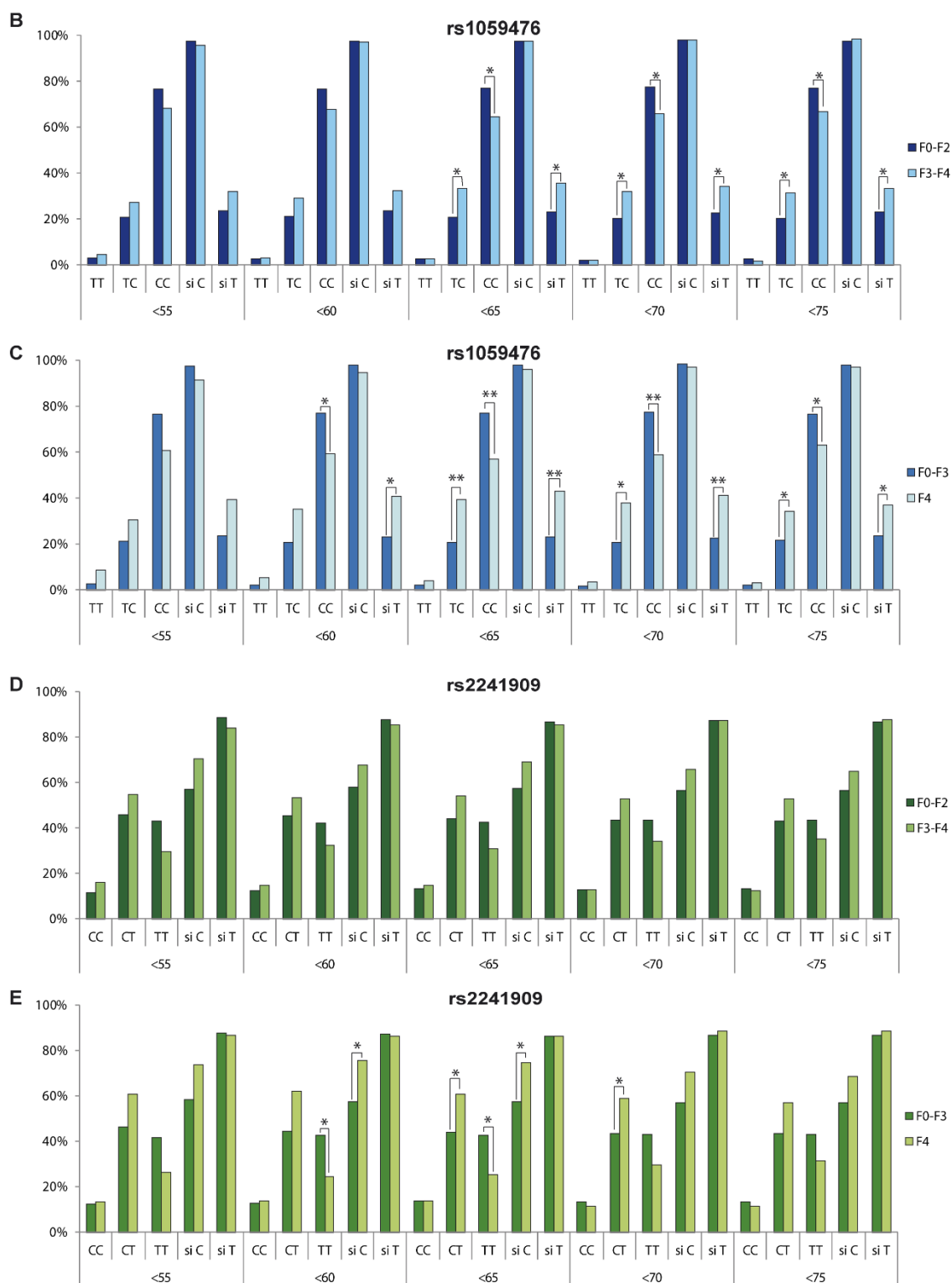
En cuanto al rs2241909, en el análisis estratificado según la edad, observamos como en el caso del alelo T, mayoritario, no se observan diferencias en ningún grupo de edad; sin embargo, si analizamos la presencia del alelo C observamos cómo hay una diferencia estadísticamente significativa entre los diferentes grupos a comparar estando más representado en pacientes con elevada fibrosis frente a baja a moderada fibrosis y en pacientes cirróticos frente a no cirróticos. Y, al igual que en el caso de rs1059476, siendo las diferencias más significativas en los grupos de menor edad.

Adicionalmente, estratificamos también la población en pacientes con una edad inferior a la mediana de las edades de todos los pacientes reclutados, es decir, 57 años (*Figura 41*). Observamos como la tendencia de distribución de los alelos era la misma que en los casos anteriores.

A

| Edad | SNP             | F0-F2 | F3-F4 | F0-F3   | F4    |       |         |       |
|------|-----------------|-------|-------|---------|-------|-------|---------|-------|
| ≤55  | Tamaño muestral | n=107 | n=44  | p valor | n=128 | n=23  | p valor |       |
|      | rs1059476       | TT    | 2.8%  | 4.5%    | NS    | 2.3%  | 8.7%    | NS    |
|      |                 | TC    | 20.6% | 27.3%   | NS    | 21.1% | 30.4%   | NS    |
|      |                 | CC    | 76.6% | 68.2%   | NS    | 76.6% | 60.9%   | NS    |
|      |                 | si C  | 97.2% | 95.5%   | NS    | 97.7% | 91.3%   | NS    |
|      |                 | si T  | 23.4% | 31.8%   | NS    | 23.4% | 39.1%   | NS    |
|      | rs2241909       | CC    | 11.2% | 15.9%   | NS    | 12.5% | 13.0%   | NS    |
|      |                 | CT    | 45.8% | 54.6%   | NS    | 46.1% | 60.9%   | NS    |
|      |                 | TT    | 43.0% | 29.5%   | NS    | 41.4% | 26.1%   | NS    |
|      |                 | si C  | 57.0% | 70.5%   | NS    | 58.6% | 73.9%   | NS    |
| si T |                 | 88.8% | 84.1% | NS      | 87.5% | 87.0% | NS      |       |
| ≤60  | Tamaño muestral | n=152 | n=62  | p valor | n=177 | n=37  | p valor |       |
|      | rs1059476       | TT    | 2.6%  | 3.2%    | NS    | 2.3%  | 5.4%    | NS    |
|      |                 | TC    | 21.1% | 29.0%   | NS    | 20.9% | 35.1%   | NS    |
|      |                 | CC    | 76.3% | 67.7%   | NS    | 76.8% | 59.5%   | 0.039 |
|      |                 | si C  | 97.4% | 96.8%   | NS    | 97.7% | 94.6%   | NS    |
|      |                 | si T  | 23.7% | 32.3%   | NS    | 23.2% | 40.5%   | 0.039 |
|      | rs2241909       | CC    | 12.5% | 14.5%   | NS    | 13.0% | 13.5%   | NS    |
|      |                 | CT    | 45.4% | 53.2%   | NS    | 44.6% | 62.2%   | NS    |
|      |                 | TT    | 42.1% | 32.3%   | NS    | 42.4% | 24.3%   | 0.043 |
|      |                 | si C  | 57.9% | 67.7%   | NS    | 57.6% | 75.7%   | 0.043 |
| si T |                 | 87.5% | 85.5% | NS      | 87.0% | 86.5% | NS      |       |
| ≤65  | Tamaño muestral | n=166 | n=81  | p valor | n=196 | n=51  | p valor |       |
|      | rs1059476       | TT    | 2.4%  | 2.5%    | NS    | 2.0%  | 3.9%    | NS    |
|      |                 | TC    | 20.5% | 33.3%   | 0.040 | 20.9% | 39.2%   | 0.010 |
|      |                 | CC    | 77.1% | 64.2%   | 0.047 | 77.0% | 56.9%   | 0.007 |
|      |                 | si C  | 97.6% | 97.5%   | NS    | 98.0% | 96.1%   | NS    |
|      |                 | si T  | 22.9% | 35.8%   | 0.047 | 23.0% | 43.1%   | 0.007 |
|      | rs2241909       | CC    | 13.3% | 14.8%   | NS    | 13.8% | 13.7%   | NS    |
|      |                 | CT    | 44.0% | 54.3%   | NS    | 43.9% | 60.8%   | 0.040 |
|      |                 | TT    | 42.8% | 30.9%   | NS    | 42.3% | 25.5%   | 0.036 |
|      |                 | si C  | 57.2% | 69.1%   | NS    | 57.7% | 74.5%   | 0.036 |
| si T |                 | 86.7% | 85.2% | NS      | 86.2% | 86.3% | NS      |       |
| ≤70  | Tamaño muestral | n=179 | n=100 | p valor | n=218 | n=61  | p valor |       |
|      | rs1059476       | TT    | 2.2%  | 2.0%    | NS    | 1.8%  | 3.3%    | NS    |
|      |                 | TC    | 20.1% | 32.0%   | 0.030 | 20.6% | 37.7%   | 0.011 |
|      |                 | CC    | 77.7% | 66.0%   | 0.047 | 77.5% | 59.0%   | 0.005 |
|      |                 | si C  | 97.8% | 98.0%   | NS    | 0.0%  | 0.0%    | NS    |
|      |                 | si T  | 22.3% | 34.0%   | 0.047 | 22.5% | 41.0%   | 0.005 |
|      | rs2241909       | CC    | 12.8% | 13.0%   | NS    | 13.3% | 11.5%   | NS    |
|      |                 | CT    | 43.6% | 53.0%   | NS    | 43.6% | 59.0%   | 0.042 |
|      |                 | TT    | 43.6% | 34.0%   | NS    | 43.1% | 29.5%   | NS    |
|      |                 | si C  | 56.4% | 66.0%   | NS    | 56.9% | 70.5%   | NS    |
| si T |                 | 87.2% | 87.0% | NS      | 86.7% | 88.5% | NS      |       |
| ≤75  | Tamaño muestral | n=197 | n=114 | p valor | n=241 | n=70  | p valor |       |
|      | rs1059476       | TT    | 2.5%  | 1.8%    | NS    | 2.1%  | 2.9%    | NS    |
|      |                 | TC    | 20.3% | 31.6%   | 0.029 | 21.6% | 34.3%   | 0.039 |
|      |                 | CC    | 77.2% | 66.7%   | 0.047 | 76.3% | 62.9%   | 0.031 |
|      |                 | si C  | 97.5% | 98.2%   | NS    | 97.9% | 97.1%   | NS    |
|      |                 | si T  | 22.8% | 33.3%   | 0.047 | 23.7% | 37.1%   | 0.031 |
|      | rs2241909       | CC    | 13.2% | 12.3%   | NS    | 13.3% | 11.4%   | NS    |
|      |                 | CT    | 43.1% | 52.6%   | NS    | 43.6% | 57.1%   | NS    |
|      |                 | TT    | 43.7% | 35.1%   | NS    | 43.2% | 31.4%   | NS    |
|      |                 | si C  | 56.3% | 64.9%   | NS    | 56.8% | 68.6%   | NS    |
| si T |                 | 86.8% | 87.7% | NS      | 86.7% | 88.6% | NS      |       |

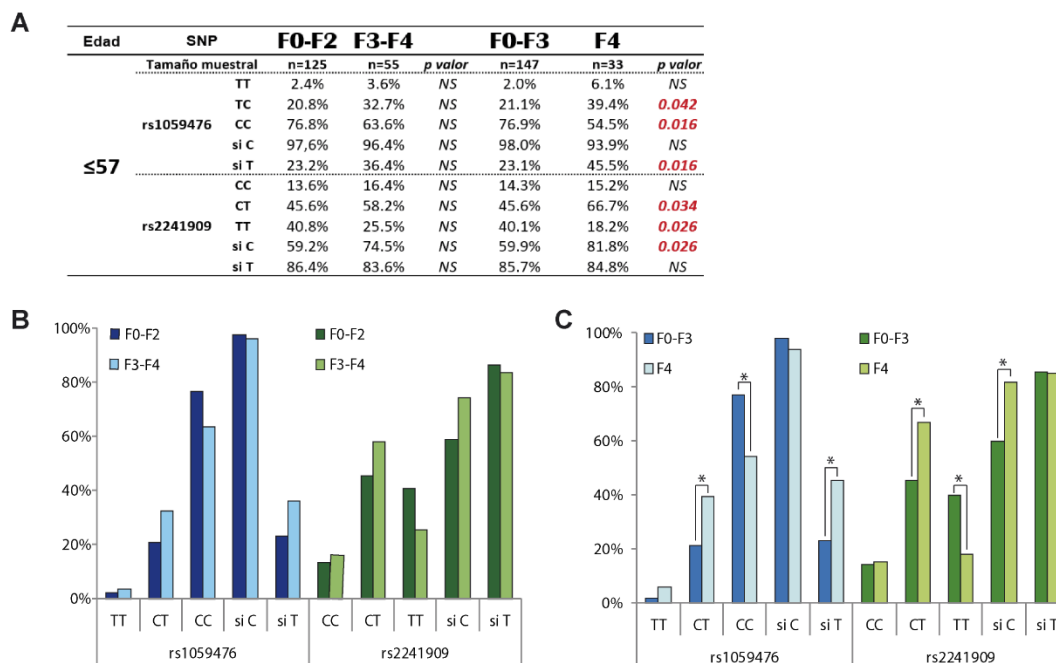




**Figura 40. Análisis estratificado según grupos de edad de la distribución alélica de rs1059476 y rs2241909.**

(A) Tabla de frecuencias de las combinaciones alélicas de rs1059476 y rs2241909 en la población de estudio estratificada en función de grupos de edad para las diferentes categorías de pacientes [pacientes con fibrosis leve a moderada (F0-F2) frente a fibrosis elevada (F3-F4) y pacientes no cirróticos (F0-F3) frente a pacientes cirróticos (F4)] y análisis estadístico comparativo mediante la prueba chi-cuadrado para evaluar la asociación de las distintas combinaciones alélicas a una progresión diferencial de la edad. El nivel de significancia usado fue \*  $p < 0.05$  y \*\*  $p < 0.01$ .

Representación gráfica de las frecuencias alélicas de rs1059476 en pacientes F0-F2 vs F3-F4 (B) y F0-F3 vs F4 (C) y de rs2241909 en pacientes F0-F2 vs F3-F4 (D) y F0-F3 vs F4 (E).

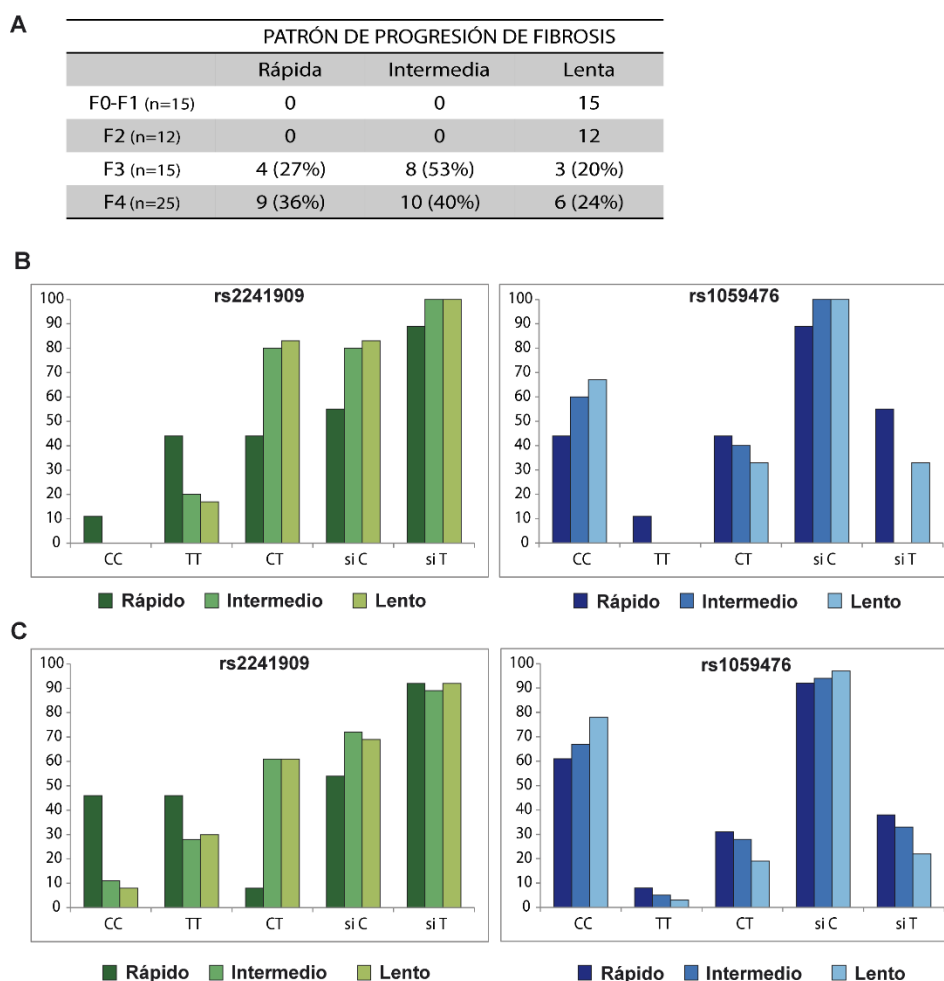


**Figura 41. Análisis de la distribución alélica de rs1059476 y rs2241909 en pacientes con una edad inferior a la mediana (Edad < 57 años).**

(A) Tabla de frecuencias de las combinaciones alélicas de rs1059476 y rs2241909 en la población de edad < 57 años para las diferentes categorías de pacientes [pacientes con fibrosis leve a moderada (F0-F2) frente a fibrosis elevada (F3-F4) y pacientes no cirróticos (F0-F3) frente a pacientes cirróticos (F4)] y análisis estadístico comparativo mediante la prueba chi-cuadrado para evaluar la asociación de las distintas combinaciones alélicas a una progresión diferencial de la edad. El nivel de significancia usado fue \*  $p < 0.05$ . Representación gráfica de las frecuencias alélicas en pacientes F0-F2 vs F3-F4 (B) y F0-F3 vs F4 (C).

Esta posible relación entre la composición alélica de la AURKB y la existencia de diferencias en el grado de progresión de la fibrosis hepática se pudo estudiar en 67 pacientes de los que se disponía de datos clínicos de calidad suficiente para hacer una estimación aproximada del patrón de progresión de la fibrosis (Figura 42).

Con estos resultados, podemos concluir por lo tanto que parece que la presencia del alelo T en la posición correspondiente al SNP rs2241909 y del alelo C en rs1059476, podrían tener un efecto protector sobre la progresión de la fibrosis hepática.



**Figura 42. Distribución alélica de las posiciones rs2241909 y rs1059476 en los pacientes en los que se pudo determinar el patrón de evolución de fibrosis.**

(A) Distribución de la población de pacientes de los que se pudo hacer una estimación aproximada del tiempo de desarrollo de fibrosis. El tiempo de progresión se determinó en base al siguiente cálculo: [Fecha de diagnóstico de forma más severa de fibrosis – Fecha estimada de infección]. Los patrones de progresión fueron: **progresores rápidos**: desarrollo de cirrosis en menos de 20 años; **progresores lentos**: desarrollo de cirrosis en más de 40 años ó desarrollo de F0-F2 tras 20 años de infección; **progresores intermedios**: resto de pacientes. Debido a los criterios de inclusión, que exigía tiempos de evolución largos para los pacientes que no habían desarrollado cirrosis, todos los pacientes con fibrosis F0-F2 incluidos presentaban patrón de progresión lenta. (B) Distribución de frecuencias alélicas en los diferentes patrones de progresión de los 25 pacientes cirróticos analizados. (C) Distribución de frecuencias alélicas en los diferentes patrones de progresión de los 67 pacientes analizados. La composición homocigótica incluyendo la variante TT no protectora, se asocia a progresión rápida en la posición rs2241909. En el caso de la posición rs1059476 la presencia del alelo T se asocia a una progresión más rápida, de forma similar a lo observado en la cohorte completa de 348 pacientes.

#### 4. ANÁLISIS MOLECULAR DE LOS SNPs DE *AURKB*

A continuación, quisimos analizar las características moleculares y funcionales de las distintas variantes polimórficas de *AURKB*. Los diferentes experimentos fueron realizados tan solo para la variante no sinónima rs1059476, ya que este SNP genera un cambio de

aminoácido que puede tener consecuencias moleculares en la proteína; mientras que en el caso de rs2241909 es una variante sinónima en la que difícilmente se podría observar ningún cambio.

#### 4.1. CARACTERIZACIÓN DE LA LÍNEA CELULAR HuH7.5

En primer lugar, caracterizamos la línea celular que usamos durante toda la experimentación.

##### Genotipado

Las células HuH7.5 fueron genotipadas para las posiciones rs2241909 y rs1059476, presentado los dos alelos definidos como *wild type*: alelo C en la posición rs2241909 y alelo T en la posición rs1059476.

##### Análisis de las variantes transcripcionales del gen *AURKB*

Analizamos también las variantes transcripcionales presentes en las células HuH7.5 realizando un RNA-seq. Los resultados con las diferentes isoformas del gen *AURKB* expresadas en las células HuH7.5 se muestran en la figura 43.

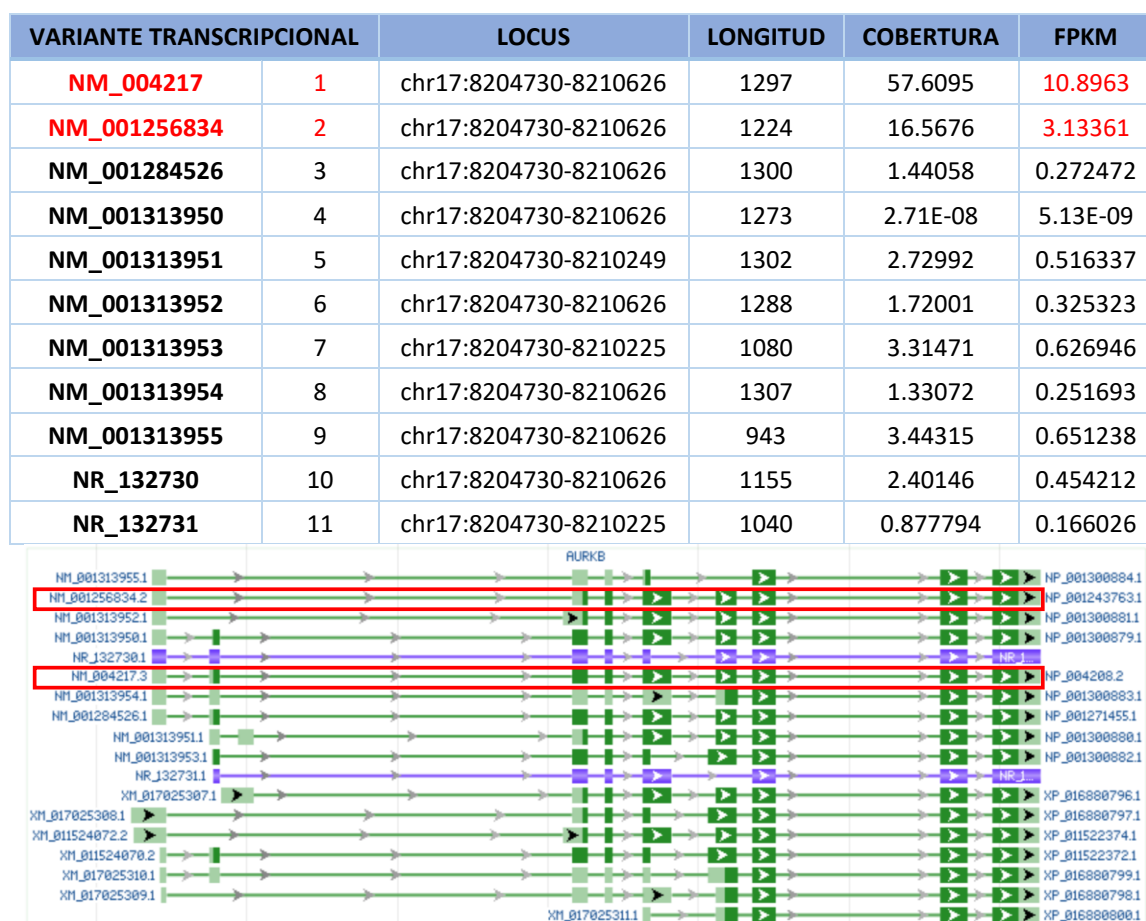


Figura 43. Isoformas de *AURKB* expresadas en las células HuH7.5.

(A) Resultados procedentes del RNA-seq, siendo FPKM el número de fragmentos por millón de kilobases, valores de expresión génica. (B) Isoformas del gen *AURKB* en la base de datos del NCBI.

Hay descritas numerosas isoformas del gen *AURKB*, en todas ellas están presentes las posiciones de los polimorfismos rs2241909 y rs1059476, ya que ambos se localizan en el último exón. Los resultados de RNA-seq mostraron que las isoformas 1 y 2 son las que se encuentran mayoritariamente expresadas en nuestro tipo celular HuH7.5, que aparecen recuadradas en la figura 43 B, estando la isoforma 1 (*AURKB*-Sv1) 3.5 veces más expresada que la 2 (*AURKB*-Sv2).

#### **4.2. CLONAJE DE LAS SECUENCIAS CODIFICANTES DE *AURKB* EN PLÁSMIDOS**

La secuencia codificante del gen *AURKB* fue clonada en los vectores de expresión bacteriana pGEX4T1 y eucariota pCDNA3.1His(A) a partir de mRNA, por lo que las regiones intrónicas no están contenidas en la secuencia nucleotídica clonada.

A partir de este producto, mediante mutagénesis dirigida, se diseñaron las diferentes combinaciones de los dos polimorfismos a estudiar. De esta manera, obtuvimos 4 secuencias diferentes para cada vector (*Tabla 6*).

| MUTACIONES                | rs2241909 | rs1059476 | NOMENCLATURA |
|---------------------------|-----------|-----------|--------------|
| AURKB wt                  | C         | T         | AURKB C/T    |
| AURKB c.1007C>T           | T         | T         | AURKB T/T    |
| AURKB p.M298T             | C         | C         | AURKB C/C    |
| AURKB c.1007C>T y p.M298T | T         | C         | AURKB T/C    |

**Tabla 6. Nomenclaturas variantes polimórficas.** La nomenclatura que se usará en adelante hace referencia a los alelos presentes en el vector correspondientes a ambos polimorfismos: rs2241909/rs1059476. La sustitución c.1007C>T corresponde al polimorfismo en posición rs2241909 y la sustitución p.M298T, equivalente a c.1015T>C a nivel de cDNA, corresponde al polimorfismo rs1059476.

#### **4.3. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD QUINASA DE LAS VARIANTES POLIMÓRFICAS DE LA *AURKB***

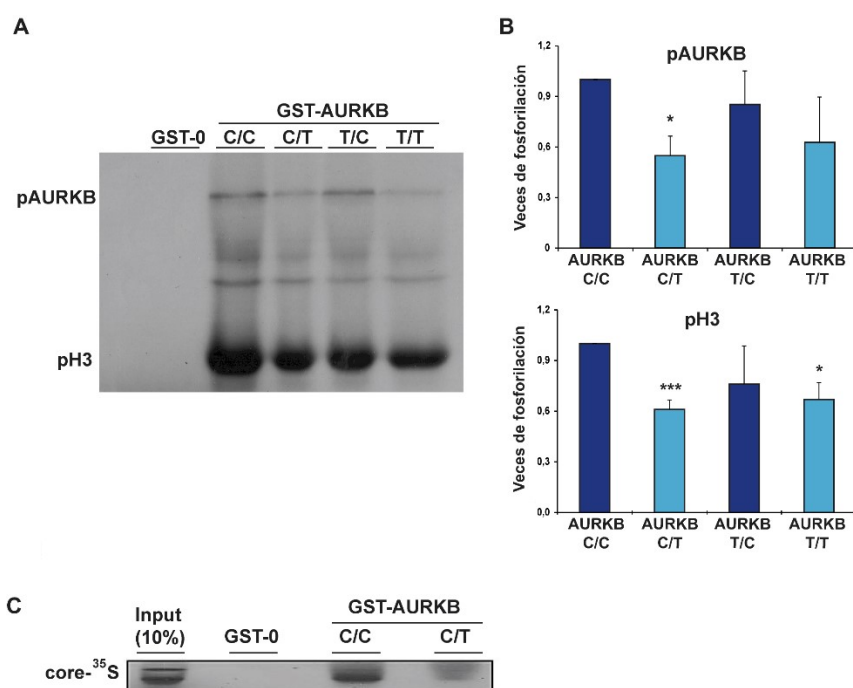
Ya que *AURKB* es una quinasa que se activa por fosforilación en diferentes aminoácidos de su secuencia y el polimorfismo rs1059476 conlleva la sustitución de una metionina por una treonina, el cual es un residuo potencialmente fosforilable, analizamos la actividad quinasa de las diferentes variantes polimórficas de *AURKB* mediante un ensayo quinasa utilizando la histona H3 como sustrato de la reacción.

El producto se resolvió en geles SDS-PAGE y se visualizó mediante autorradiografía donde se observó tanto la autofosforilación de *AURKB* como la de la histona H3. Como se puede

observar en la figura 44 A y B, las variantes polimórficas AURKB C/C y AURKB T/C presentaban mayor actividad quinasa que las variantes AURKB C/T y AURKB T/T, reflejado en una mayor señal de fosforilación, en la histona H3 y en la propia AURKB. Por lo tanto, aquellas construcciones que presentaban el alelo C en la posición rs1059476 (AURKB C/C y T/C) presentaban una actividad quinasa mayor mientras que la presencia del alelo C o T en la posición rs2241909 no tenía ninguna repercusión sobre la capacidad quinasa de AURKB.

#### **4.4. DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD DE INTERACCIÓN DE LAS VARIANTES POLIMÓRFICAS DE LA AURKB CON LA PROTEÍNA VIRAL CORE**

En estudios previos del laboratorio habíamos demostrado que la proteína core inhibía la actividad de AURKB por interacción directa de las dos proteínas a través del dominio quinasa de la AURKB. Por esta razón, quisimos analizar si las variantes polimórficas de la AURKB interaccionaban con core de manera diferencial. Para ello llevamos a cabo un ensayo de interacción proteína-proteína *in vitro* o *pull down* en el cual la proteína core se tradujo *in vitro* en un lisado de reticulocitos en presencia de metionina marcada radiativamente con S<sup>35</sup>, para posteriormente incubarse con las proteínas de fusión de las variantes polimórficas de la posición rs1059476 de AURKB y, en su defecto, con el control *glutathione S-transferase* (GST-0). En la figura 44 C se puede observar que la variante que contiene el nucleótido C (AURKB C/C) presenta una mayor interacción con la proteína core que la variante de AURKB que presenta una T en la misma posición (AURKB C/T). La especificidad de tal interacción se demostró por la ausencia total de señal en la muestra control con GST-0.

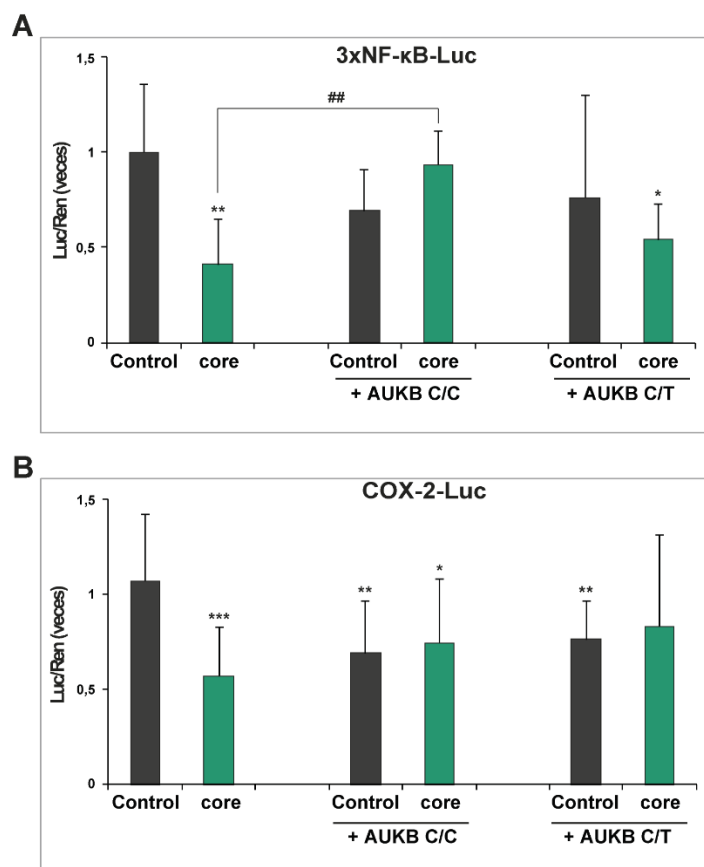


**Figura 44.** La actividad quinasa de la AURKB y su capacidad de interacción física con la proteína viral core difieren en presencia del polimorfismo rs1059476.

(A) Ensayo quinasa de las variantes polimórficas de la AURKB sobre la histona H3. Autorradiografía y detección de la autofosforilación de la quinasa (pAURKB) y de la fosforilación de su sustrato (pH3). (B) Cuantificación por densitometría y representación gráfica de las veces de fosforilación de pAURKB y pH3. (C) Ensayo de interacción de proteínas *in vitro*. Las proteínas de fusión GST-AURKB C/C, GST-AURKB C/T y GST-0 fueron incubadas en presencia de la proteína core marcada radiactivamente con  $^{35}\text{S}$ . El input representa el 10% de la cantidad total de proteína core utilizada en la interacción.

#### 4.5. DETERMINACIÓN DEL EFECTO DE LOS POLIMORFISMOS DE AURKB EN GENES DE LA RUTA INFLAMATORIA

En experimentos anteriores habíamos demostrado que la presencia de la proteína core disminuía la transcripción de *NF-κB* y *COX-2* a través de la AURKB. A la vista de estos resultados, quisimos analizar si los diferentes SNPs del gen *AURKB* presentaban diferencias en el potencial de reversión de la inhibición mediada por la proteína viral core.



**Figura 45.** La inhibición en la transcripción de *NF-κB* y *COX-2* mediada por core es revertida en presencia de las variantes polimórficas de AURKB para rs1059476 (AURKB C/C y AURKB C/T).

Actividad luciferasa de 3xNF-κB-Luc (A) y COX-2-luc (B) en células HuH7.5 transfectadas con pCMV-core1b en presencia y ausencia de las variantes polimórficas AURKB C/C y AURKB C/T. La cuantificación de la actividad luciferasa de todos los experimentos recoge los resultados de al menos tres experimentos independientes llevados a cabo por triplicado. \* indica las diferencias en los niveles de transcripción de los genes analizados respecto a las células sin transfectar con core ni AURKB y # entre células transfectadas con core y células con core y con AURKB C/C o AURKB C/T.

Con este fin, determinamos la actividad transcripcional de los genes *NF-κB* y *COX-2* transfectando sus respectivos plásmidos *reporters* con la secuencia promotora de los mismos unida a la luciferasa en células HuH7.5, cotransfectadas con vectores de expresión de las diferentes variantes polimórficas de la AURKB, en presencia y ausencia de la proteína viral core. A las 72 horas se determinó la actividad luciferasa y, como se muestra en la figura 45, observamos que la sobreexpresión tanto de la AURKB C/C como de la AURKB C/T mostraban una tendencia a revertir el efecto inhibitorio de core en la transcripción de ambos genes, aunque en el caso de NF-κB, el efecto de la variante AURKB C/T fue menor.

#### **4.6. ANÁLISIS DE LA SOBREEXPRESIÓN DE LAS VARIANTES AURKB C/C Y AURKB C/T (rs1059476) DURANTE LA MITOSIS EN CÉLULAS HuH7.5**

La AURKB participa en el ciclo celular durante la fase de mitosis, por lo que quisimos analizar mediante ensayos de inmunofluorescencia si la presencia del polimorfismo rs1059476 alteraba su expresión durante el proceso de citocinesis.

Células HuH7.5 fueron transfectadas con los vectores de expresión de la AURKB con las dos variantes para la posición rs1059476 (AURKB C/C o AURKB C/T). A las 48 horas, las células se fijaron y se incubaron con los anticuerpos anti AURKB (marcado en rojo), que reconoce ambos SNPs y con  $\alpha$ -Tubulina (en verde). Además, los núcleos se tiñeron con DAPI. Como se muestra la figura 46 A, la expresión de AURKB se localiza claramente en la zona del anillo contráctil en las células que estaban en telofase durante el proceso de citocinesis. La expresión de AURKB fue similar en las células que sobreexpresaban la variante C/C o C/T. Sin embargo, cuando contabilizamos el número de células en mitosis, observamos que el índice mitótico era mayor en aquellas células que sobreexpresaban la variante polimórfica AURKB C/C (Figura 46 B).

#### **4.7. DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD DE INTERACCIÓN DE LAS VARIANTES POLIMÓRFICAS DE LA AURKB CON LA PROTEÍNA CHMP4C**

Ya que habíamos observado una menor tasa de división celular en las células que sobreexpresaban C/T, quisimos analizar si podría deberse a un defecto en el proceso de mitosis. La AURKB forma parte del complejo pasajero de los cromosomas (CPC), donde juega un importante papel evitando defectos en la segregación cromosómica. Ejerce su función fosforilando numerosas proteínas, entre ellas la CHMP4C, proteína que forma parte del cuerpo de abscisión, fundamental para marcar el tiempo correcto de la abscisión mediante la inhibición de este proceso cuando es fosforilada por la AURKB [79, 80, 115]. Por ello,



analizamos si las variantes AURKB C/C y C/T interaccionaban con CHMP4C de manera diferencial. Para ello llevamos a cabo un ensayo de interacción proteína-proteína *in vitro* o *pull down* en el cual las proteínas AURKB C/C y C/T se tradujeron *in vitro* en un lisado de reticulocitos en presencia de metionina marcada radiactivamente con  $^{35}\text{S}$ , para posteriormente incubarse con la proteína de fusión GST-CHMP4C o, en su defecto, con el control *glutathione S-transferase* (GST-0). En la figura 47 se puede observar que ambas variantes interaccionan de la misma manera con la CHMP4C. La especificidad de tal interacción se demostró por la ausencia de señal en la muestra control con GST-0.



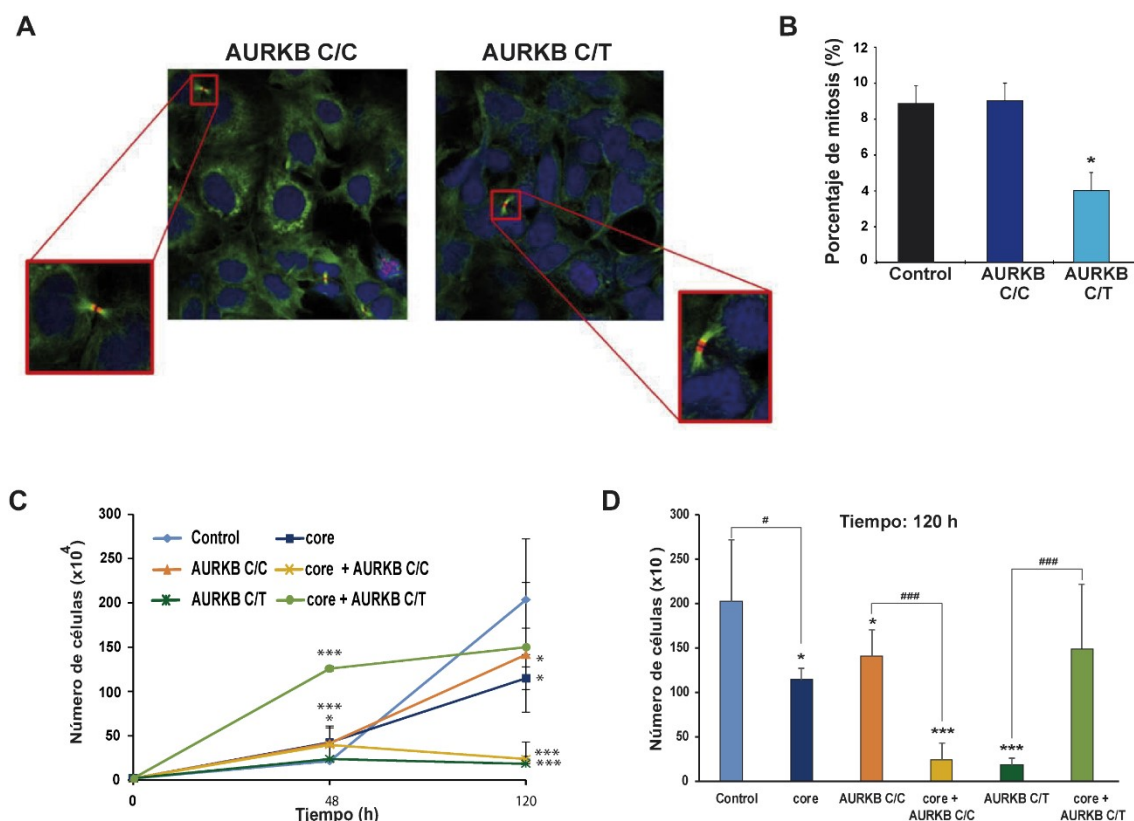
**Figura 47. AURKB C/C y AURKB C/T interaccionan de la misma manera con la CHMP4C.** Ensayo de interacción proteína-proteína *in vitro*. Las proteínas de fusión GST-CHMP4C y GST-0 fueron incubadas en presencia de las proteínas AURKB C/C y alternativamente C/T marcadas radiactivamente con  $^{35}\text{S}$ . El input representa el 10% de la cantidad total de las proteínas AURKB C/C y C/T utilizadas en la interacción.

#### **4.8. ANÁLISIS DE LA SOBREEXPRESIÓN DE LAS VARIANTES AURKB C/C Y AURKB C/T (rs1059476) EN LA PROLIFERACIÓN CELULAR**

A la vista del resultado anterior, donde habíamos observado una disminución en el número de células en mitosis en aquellas células que sobreexpresaban la AURKB C/T, analizamos la proliferación de las células en presencia de las dos variantes de rs1059476.

Contabilizamos el número de células 48 y 120 horas después de la transfección con los vectores de expresión para las dos variantes de AURKB (Figura 46 C). A las 48 horas, las células sobreexpresando ambos SNPs mostraban una tasa de proliferación similar. Sin embargo, a las 120 horas las células que expresaban AURKB C/C proliferaban más que aquellas que expresaban AURKB C/T, aunque en ambos casos el número de células era menor que en presencia del vector vacío (pCMV-HA-0). Sin embargo, y ya que resultados previos del laboratorio mostraban que la proteína core del VHC inhibía la proliferación, junto con el hecho de que core interaccionaba de forma diferencial con las dos variantes polimórficas de AURKB (C/C y C/T), nos planteamos analizar el efecto conjunto de la expresión de core (pCMV-HA-core) y la sobreexpresión de ambos SNPs de AURKB. Como se observa en la figura 46 C, a las 120 horas, la sobreexpresión de core provocó una disminución en el número total de células respecto a la basal, como habíamos descrito previamente. Por otro lado, 48 horas después de la transfección, la sobreexpresión de core conjuntamente con AURKB C/T provocó un aumento significativo en el número de células, manteniéndose este efecto hasta 120 horas después de

la transfección. Sin embargo, aquellas células sobreexpresando core y AURKB C/C mostraban una disminución significativa de la proliferación con respecto a la observada en las células que solo expresaban AURKB C/C junto con el plásmido pCMV-HA vacío.



**Figura 46. La sobreexpresión de las variantes de AURKB para el polimorfismo rs1059476 afectan a la proliferación celular de manera diferencial.**

(A) Inmunofluorescencia de células HuH7.5 sobreexpresando las variantes de AURKB para rs1059476. 72 horas después de la transfección, las fueron teñidas con los anticuerpos de AURKB (DsdRed) y  $\alpha$ -Tubulina (GFP) y marcadas con Dapi. (B) Representación gráfica del porcentaje de mitosis en las células HuH7.5 respecto al control a partir de la determinación del número de células en mitosis y el número total de células en las muestras procedentes de la inmunofluorescencia. La estadística de estos resultados procede de la realización de dos experimentos independientes. (C, D) Células HuH7.5 co-transfectadas con la proteína core y las variantes de AURKB para rs1059476. 48 y 120 horas después de la transfección, fueron cuantificadas mediante tinción con *Trypan blue* al 0.4%. La estadística se realizó con los resultados procedentes de al menos tres experimentos independientes. \* indica las diferencias respecto a la basal sin core ni AURKB y # indica las diferencias respecto al control de cada variante sin core. \* y #  $P > 0.05$ , \*\*\* y ###  $P < 0.001$ .

---

# DISCUSIÓN

---

El desarrollo y progresión de la fibrosis hepática y la aparición de CHC en pacientes con enfermedad hepática crónica se han relacionado con la acumulación de alteraciones genéticas y epigenéticas que pueden afectar a numerosas vías de señalización relacionadas con la proliferación celular, supervivencia, diferenciación y angiogénesis [43]. Se ha demostrado que algunos virus han desarrollado mecanismos especializados para modular los procesos epigenéticos que promueven la persistencia de la infección y la viabilidad de la célula huésped [116]. El estudio de cómo los procesos epigenéticos son iniciados y establecidos tras la infección por VHC es de especial interés para determinar si estos pueden contribuir a la progresión de la enfermedad hepática en pacientes con hepatitis crónica C. En este sentido, se ha descrito como la infección del VHC se asocia a modificaciones a nivel de metilación de DNA [39, 110, 117], así como la utilización por parte del virus del miRNA-122 celular para promover la replicación viral [118]. Sin embargo, se dispone de poca información sobre la capacidad del VHC, un virus con un ciclo replicativo estrictamente citoplasmático, de inducir modificaciones postraduccionales de histonas en la célula huésped, uno de los mecanismos de regulación epigenética más importantes.

Los resultados obtenidos en esta tesis en los experimentos de infección de la línea celular de hepatoma HuH7.5 con un clon infeccioso de VHC demuestran que el virus presenta una importante actividad reguladora de modificaciones postraduccionales de histonas. Así, se han confirmado resultados previos [46] que asocian la infección por VHC con un aumento en los niveles de la dimetilación de la histona H3 en el residuo de Lisina 9, una marca asociada a regiones de heterocromatina relacionada con el silenciamiento génico (*Figura 14 A*). También hemos descrito como tanto la infección con el VHC como la expresión de la proteína core inhiben la fosforilación de la histona H3 en el residuo de Ser10 (*Figura 14 A,B*). Esta observación coincide con resultados previos de otros grupos en los que se sugiere que el VHC bloquea la entrada en mitosis, observándose una disminución en los niveles de H3Ser10ph [66].

Los experimentos de transfección con los plásmidos de expresión de las proteínas core y NS5A en la línea celular HuH7.5 demostraron que el efecto inhibitorio de la actividad H3Ser10ph estaba mediado de forma específica por la proteína viral core, mientras que no se observaba ningún efecto cuando se sobreexpresaba la proteína NS5A (*Figura 14 B, C*). El efecto inhibitorio asociado a la expresión de core se mantuvo incluso a niveles bajos de expresión de la proteína viral. El papel relevante de la proteína core en la regulación de esta marca epigenética fue confirmado en cultivos primarios de hepatocitos.

Los resultados de este trabajo demuestran que al menos uno de los mecanismos por los que el VHC inhibe la fosforilación de la H3Ser10ph mediante la acción de su proteína core, es a

través de la inhibición de la actividad enzimática de AURKB presente en las células huésped. La actividad de la AURKB en el centrómero está regulada a través de la quinasa CHK1, que la fosforila aumentando su actividad [119], y de las fosfatasas PP1 y PP2A, que la defosforilan inhibiéndola [75]. Se ha descrito también como la infección por el VHC promueve la activación de la fosfatasa PP2A [120], y que la expresión de la NS5B reduce los niveles de fosforilación de la CHK1 provocando su inhibición [121]. Sin embargo, a pesar de la regulación ejercida por CHK1 y PP2A sobre la actividad de la AURKB, nuestros resultados indican que estas actividades no son las responsables de la disminución en H3Ser10ph mediada por la proteína core. Con ensayos de interacción de proteínas hemos demostrado como el primer dominio de la nucleocápside de core es suficiente para unirse al dominio catalítico de la AURKB (*Figuras 16-17*) bloqueando la actividad quinasa de AURKB, en concordancia con la disminución en los niveles observados de la H3Ser10ph y con la disminución en los niveles de fosforilación de la propia AURKB en el residuo Thr-232, necesario para su activación [122].

Nuestros datos indican que otras proteínas virales podrían estar contribuyendo también a la inhibición de la fosforilación de este residuo, ya que en presencia del VHC y del inhibidor de la AURKB, ZM447439, sigue observándose un efecto de represión en células infectadas con respecto a los niveles basales en células sin infectar y en presencia del inhibidor (*Figura 15 C*); mientras que en células que sobreexpresan la proteína core, el tratamiento con el inhibidor anuló completamente la inhibición de la H3Ser10ph mediada por la proteína viral (*Figura 15 D*).

Un efecto de las infecciones por los virus de las hepatitis es la inducción de procesos inflamatorios que pueden favorecer la progresión de la fibrosis y el desarrollo de cirrosis y CHC [38]. Sin embargo, nuestros resultados demuestran una inhibición en la transcripción de *NF-κB* tras la infección y tras la expresión de core en células HuH7.5 y en hepatocitos primarios (*Figura 20 A,B*), a pesar del papel que juega la vía de señalización de *NF-κB* en la respuesta proinflamatoria [31]. De la misma manera, hemos observado una inhibición en la transcripción y expresión del gen *COX-2* (*Figura 22 A,B*), también implicado en la señalización inflamatoria. De acuerdo con nuestros resultados, los análisis de microarrays de DNA demuestran como la expresión de core inhibe las señales proinflamatorias en células de hepatoma humano HepG2 [5]. En macrófagos y células HEK293 y HeLa, core también inhibe la activación de *NF-κB* y la expresión de *COX-2* mediante la interacción directa con *IKKβ*, quinasa de los inhibidores *IκBs*, que mantienen a *NF-κB* en el citoplasma impidiendo ejercer su función [32], aunque también es posible que la disminución en los niveles globales de H3Ser10ph se encuentre reflejada en el promotor de *IKKβ*, impidiendo su transcripción y promoviendo la infectividad viral [40]. Al

igual que los poxvirus, la disminución en la transcripción de *NF-κB* mediada por el VHC podría tratarse de un mecanismo para interferir con la respuesta inflamatoria de las células hospedadoras [5, 33].

Por otro lado, *NF-κB* es un factor de señalización que participa en el control de la proliferación y actúa como agente anti-apoptótico mediante la regulación de *TNF-α* [31]. Se ha descrito que la infección por el VHC induce apoptosis inhibiendo la activación de *NF-κB* y, consecuentemente, la transcripción de proteínas anti-apoptóticas reguladas por este factor de transcripción, como Bcl-XL (linfoma de células B-extra larga), XIAP (proteína inhibidora de apoptosis ligada al X) y c-FLIP (proteína inhibidora de FLICE celular) [123, 124]. De hecho, en nuestros resultados observamos un aumento en los marcadores de apoptosis: aumenta la digestión de PARP y disminuyen los niveles del factor anti-apoptótico Bcl-XL (*Figura 20 C*) que podría estar relacionado con la disminución de *NF-κB*. A pesar del aumento de la apoptosis, las células infectadas con VHC siguen proliferando, aunque en menor proporción en comparación con las células no infectadas (*Figura 19 B,D*). En general, el incremento de la apoptosis se cree que está relacionado con la disminución de la carga viral; sin embargo, en hígados infectados con el VHC, a pesar del aumento de apoptosis en hepatocitos, el virus sigue presente [124]. En estudios previos se ha demostrado también un aumento de los niveles de apoptosis en las etapas iniciales de la infección viral [33]. De esta manera, es posible que mediante la inducción de apoptosis y la inhibición de la señalización proinflamatoria (represión de la transcripción de *NF-κB* y *COX-2*), el VHC “asegure” su infección a la vez que inhibe la respuesta inmune antiviral.

El VHC, a través de la proteína core, regula la expresión de *COX-2* por mecanismos epigenéticos y no requiere la presencia del sitio de unión de *NF-κB* (*Figura 23*). Los experimentos de ChIP muestran como la proteína core y la infección por el VHC producen el silenciamiento epigenético del promotor del gen *COX-2* mediante la reducción en el reclutamiento de la proteína AURKB al promotor y la disminución de los niveles de H3Ser10ph, hecho que podría deberse a la interacción física que la proteína viral core establece con la AURKB de la célula huésped (*Figura 24*). En este contexto, la inhibición de la actividad de AURKB podría interpretarse como un mecanismo viral para inhibir la transcripción génica de genes proinflamatorios, ya que la sobreexpresión de la AURKB revierte el efecto inhibitorio mediado por el VHC y por core en la transcripción de ambos genes, *NF-κB* y *COX-2*. Estos resultados coinciden con lo ya descrito previamente en otros estudios que demuestran como la AURKB no solo desempeña su función en mitosis, sino que también puede jugar un papel como regulador de la transcripción [100-102]. La supresión de la AURKB mediante ensayos de siRNA o la inhibición de su actividad usando el inhibidor ZM447439, también provoca la inhibición de la transcripción basal de los genes *reporter* de luciferasa *NF-κB* y *COX-2* (*Figuras*

21 B,C y 22 C). Estos resultados sugieren un efecto regulador positivo de la AURKB en la transcripción de los genes *NF-κB* y *COX-2*. Este punto debe ser tomado en consideración para futuros estudios.

Varios trabajos han enfatizado la relación existente entre la infección viral y la tasa de replicación con la respuesta inflamatoria, donde la activación de la vía *NF-κB* es esencial para contrarrestar numerosas infecciones bacterianas y víricas, la provocada por el VHC entre ellas [33, 40, 125]. Si la sobreexpresión de AURKB tiene la capacidad de reactivar la vía proinflamatoria y disminuir la infectividad específica del VHC (*Figuras 21 D y 22 D*), la inhibición en la actividad de la AURKB mediada por core podría ser un mecanismo para aumentar la infectividad del VHC, como demostramos mediante el silenciamiento de la AURKB (*Figura 25*). Apoyando nuestros resultados, se ha demostrado la interacción física y funcional de AURKB y AURKA con *IKKβ* e *IKKα* conduciendo a la activación de *NF-κB* en mieloma múltiple [126]. Por otro lado, numerosas publicaciones subrayan la importancia de otras actividades epigenéticas como moduladoras de la infectividad viral, DNMT1 y 3B en el caso del VHC [127] y CBP/p300 en el caso del adenovirus [128].

Un aspecto especialmente importante es el análisis de la evolución de la regulación epigenética de las histonas en un sistema dinámico que pueda simular la situación real del hígado infectado: un órgano en el que el virus durante largos periodos de tiempo se va adaptando al tejido del huésped tras ciclos sucesivos de replicación/selección. Para ello, se utilizó el sistema de selección por pases sucesivos de un clon infeccioso en un sistema celular, la línea celular HuH7.5, que no coevoluciona simultáneamente, observándose un incremento del *fitness* viral, especialmente evidente tras 200 pases de infección [12]. Cabe destacar que, en paralelo al incremento del *fitness* viral, en esta tesis hemos observado que se producía también un aumento en la inhibición de los niveles de H3Ser10ph y de la expresión de AURKB. Una posible explicación de esta asociación podría ser la existencia de diferencias entre dichas variantes del clon infeccioso a nivel de replicación y, en consecuencia, del número de partículas virales; o bien al hecho de que durante la infección viral, el virus utiliza la maquinaria celular de traducción de proteínas, de manera que se produce un aumento en la síntesis de las proteínas virales en detrimento de la síntesis de proteínas necesarias para la célula [12]. Además, el *background* genético de los pases virales se va modificando y divergiendo en cepas caracterizadas por un aumento de la capacidad citopática y unos viriones con mayor densidad [12], lo cual podría explicar el efecto más exacerbado del VHC-p200 en nuestras células. Apoyando estas explicaciones, cuando se compararon los niveles de inhibición de la H3Ser10ph entre células infectadas con el clon infeccioso original y células transfectadas con el

vector de expresión de la proteína del core, del mismo genotipo (VHC-2a) que el clon infeccioso, se confirmó que el grado de modificación de la histona se asociaba a una mayor expresión de la proteína del core (*Figura 14 D*), sugiriendo que el efecto dependía del nivel de expresión de la proteína viral. No obstante, para confirmar estos resultados sería necesario sobreexpresar cantidades crecientes de proteína core 2a en células HuH7.5 y cuantificar los niveles de H3Ser10ph. Otro efecto a tener en cuenta es la evolución de la proteína del core viral durante el proceso de selección de variantes en los sucesivos pases. Dado que el efecto observado se regula a través de una interacción directa con la actividad AURKB, no se puede descartar que las nuevas variantes presenten una capacidad de interacción diferente.

Asimismo, hemos observado que el VHC es capaz incluso de inhibir los niveles globales de expresión de la proteína AURKB cuando analizamos sus niveles a mayor tiempo de infección (96 horas en el virus VHC-p0 de menor *fitness*) o tras la infección con virus de mayor *fitness*, VHC-p200 (*Figura 30*). Estos resultados parecen indicar que estadios de infección baja podrían dar lugar a la represión de la actividad quinasa y que la inhibición de su expresión sería directamente proporcional al número de partículas virales, ya que los pases virales difieren entre sí por un aumento en la capacidad replicativa del virus. Sería interesante establecer el origen de las diferencias, utilizando para ello virus con un *fitness* replicativo elevado a una MOI inferior con el fin de igualar el número de partículas virales en el momento de preparación de los extractos. Otra posibilidad es que el VHC tuviera un papel relevante en la regulación de la expresión del gen *AURKB*, aunque para demostrar esta hipótesis sería necesario analizar sus niveles de mRNA mediante qRT-PCR en células infectadas con los distintos clones, VHC-p0 y VHC-p200, a partir de 72h de infección. En cualquier caso, el modelo utilizado de pases sucesivos en sistemas de cultivo *in vitro* es únicamente una aproximación experimental, y obviamente la confirmación de esta asociación entre *fitness* viral y regulación epigenética requiere la confirmación en sistemas *in vivo*. En este sentido, sería de especial utilidad el análisis de muestras secuenciales de tejido hepático de pacientes infectados, tomadas en fases iniciales de la infección y tras años de progresión. Sin embargo, dado que la práctica de la biopsia hepática es un proceso clínicamente invasivo, desde que se dispone de técnicas de elastometría para evaluar el grado de fibrosis hepática es éticamente inaceptable la realización de este tipo de estudios, considerando además que al inicio de esta tesis no se disponía de evidencias que sugirieran su realización.

Nuestros datos muestran que la AURKB juega un papel relevante en la infectividad viral (*Figura 25*), y que su interacción con la proteína core parece ser importante en la regulación de genes relacionados con la respuesta inflamatoria. Además, debido a que la interacción directa con core regula la actividad de la AURKB, es posible que variantes genéticas presentes en el



gen *AURKB* puedan tener alguna relación con la evolución de la enfermedad hepática y la progresión de la fibrosis en estos pacientes. En la cohorte analizada, hemos descrito la asociación estadísticamente significativa de los polimorfismos rs2241909 y rs1059476 - presentes en la región codificante del gen *AURKB*- donde la presencia de los alelos C y T respectivamente se asocia con estadios de la enfermedad más avanzados (*Figuras 37-38*), especialmente en determinados rangos de edad (*Figuras 40-41*). Sin embargo, a la hora de interpretar los resultados de asociación entre distribución alélica y progresión de la enfermedad, hay que tener en cuenta que la cirrosis es el estadio final de la enfermedad hepática crónica, por lo que, de manera general, si el estímulo que produce el daño hepático continúa presente, se va a producir un daño cada vez mayor hasta llegar a las formas de fibrosis más graves. En este sentido, la edad de los pacientes y el tiempo de infección se asocian con un riesgo mayor de desarrollar cirrosis, tal como se confirma en nuestra cohorte de pacientes (*Figura 36*). Dado que el tiempo de infección de nuestros pacientes es en término medio bastante prolongado, el efecto que pudieran tener los diferentes polimorfismos sobre la potenciación del desarrollo de fibrosis podría quedar enmascarado por la progresión de la enfermedad debido al tiempo de infección, incluso en pacientes con menor propensión. En este sentido, el análisis de la distribución alélica de las posiciones de interés y su correlación con el tiempo de desarrollo de las fases más avanzadas de fibrosis en cada paciente podría determinar de una forma más clara esta asociación. Sin embargo, en la práctica real, el tiempo de infección es un dato clínico de muy difícil obtención. En este sentido, en nuestra cohorte de pacientes únicamente se dispuso de información clínica de calidad suficiente para estimar el tiempo de desarrollo de cirrosis en 67 (15%) de los pacientes. Por ello, en esta tesis hemos planteado una aproximación consistente en la estratificación del análisis en diferentes grupos de edad, asumiendo que el grupo de pacientes con fibrosis avanzada y/o cirrosis de edad más joven estaría constituido por *progresores* rápidos, en los que pueden darse alguna predisposición genética, con respecto a este mismo tipo de pacientes con edades más elevadas.

Al analizar la población así estratificada se observó que la correlación entre la distribución alélica de los polimorfismos de *AURKB* y el desarrollo de fibrosis avanzada y/o cirrosis se hacía estadísticamente más significativa cuando el límite de edad de la población analizada se iba haciendo más bajo (*Figura 40*). Esta tendencia que alcanza su mayor significación para la población de edad inferior a 65 años se pierde finalmente al analizar la población más joven (inferior a 55 años) debido a una disminución considerable del tamaño muestral. El análisis de los 67 pacientes en los que se pudo determinar la velocidad de progresión de fibrosis,

especialmente en los que habían desarrollado cirrosis, reflejó asimismo diferencias entre los distintos alelos, con asociación de la progresión rápida a la presencia de alelo T en la posición rs1059476. Evidentemente, este análisis tiene un valor aproximativo, y para confirmar si realmente el desarrollo rápido de formas avanzadas de fibrosis y/o cirrosis se puede asociar, entre otros, a la distribución alélica de los polimorfismos de AURKB se requeriría una población más amplia en la que se dispusiera de datos más fiables del tiempo de infección.

Aún no hemos analizado si la presencia de los SNPs de AURKB es también relevante en pacientes que desarrollan CHC frente a aquellos que, tras largos años de infección, no desarrollan CHC. Desde un punto de vista clínico se considera que el potencial oncogénico de CHC está relacionado con la evolución de la fibrosis, por lo que cabría esperar que pacientes con una mayor predisposición a desarrollar cirrosis también tuvieran una mayor predisposición a desarrollar CHC. No obstante, si las diferentes variantes de AURKB pueden utilizarse como potenciales marcadores de CHC está aún por demostrar.

Apoyando los datos clínicos obtenidos, se confirmó la existencia de diferencias en la actividad quinasa y en los niveles de interacción con la proteína core viral entre las diferentes variantes alélicas de AURKB en ensayos *in vitro* (Figura 43). Así, la variante alélica C del polimorfismo rs1059476, más prevalente en pacientes no cirróticos, caracterizada por un cambio de metionina a treonina en la secuencia aminoacídica, se asocia a una mayor actividad quinasa. Esta diferencia se explicaría porque el cambio de aminoácido podría afectar a la conformación tridimensional final del dominio catalítico de la proteína; o bien podría indicar que la treonina en la posición 298 puede ser un nuevo sitio de fosforilación de AURKB necesario para su actividad quinasa, pero fuera del sitio catalítico descrito hasta el momento. En este sentido, se ha descrito la existencia de un sitio de fosforilación adicional en la posición 331 correspondiente a una serina, cuya fosforilación es esencial para la completa activación de AURKB [82]. Asimismo, se observó una diferencia entre ambas variantes a nivel de interacción con la proteína del core, que justificaría un diferente comportamiento durante la infección viral. Dado que la modificación del aminoácido queda fuera de la región de interacción entre la proteína del core y la AURKB en base a los experimentos de mapeo realizados en esta tesis, las diferencias de interacción podrían explicarse posiblemente por cambios en la conformación de la proteína.

Otro aspecto interesante es el papel regulador de la transcripción de AURKB, tras la sobreexpresión de las variantes para rs1059476 (AURKB C/C y AURKB C/T). Ambas variantes, fueron capaces de revertir el efecto inhibitor de core en la regulación de *COX-2* y *NF-κB*, aunque el efecto de la variante AURKB C/T fue menor en la reactivación de la expresión de *NF-κB* (Figura 44). Estos resultados podrían reflejar el hecho de que, a pesar de la disminución de

la actividad quinasa de la variante AURKB C/T, esta es suficiente para mantener los niveles de fosforilación de la histona H3. La marca epigenética H3Ser10ph es un regulador positivo de la transcripción [129], por lo que los niveles observados en el ensayo quinasa pueden ser suficientes para revertir el efecto de core.

Más difíciles de explicar son las diferencias observadas entre las variantes alélicas sinónimas de la posición rs2241909, de la que existen, además de nuestros resultados, evidencias previas de su importancia funcional y su asociación con diversos tipos de cáncer [68, 84]. Sin embargo, los análisis estructurales de esta variante no parecen indicar una relación con cambios en la estructura secundaria del mRNA ni la creación de sitios de *splicing* alternativo, por lo que algunos estudios [68, 84] señalan que el efecto de rs2241909 podría deberse al *linkage* de este SNP con otra variante funcional del gen AURKB.

En este sentido, la unión de factores de transcripción a secuencias de DNA les confiere propiedades como reguladores de la expresión génica y de diversas funciones celulares. La presencia de SNPs que afectan a las secuencias de unión para estos factores podría alterar la transcripción afectando la expresión de determinados genes que, en última instancia, podrían condicionar el curso de una enfermedad [86]. Aunque los SNPs de AURKB no están en la región promotora, hemos analizado mediante análisis *in silico* los posibles factores de transcripción que podrían unirse a la secuencia del DNA donde se localizan el rs2241909 y el rs1059476 (Tabla 5). En el caso de rs2241909 hemos descrito como en presencia del alelo C, la secuencia es reconocida por los factores de transcripción: PAX-5, P53, STAT4, ETS-1 y ELK-1; mientras que en presencia del alelo T, se pierde la secuencia de reconocimiento de los 3 últimos. STAT4 (transductor de la señal y activador de la transcripción 4) es un factor de transcripción relacionado con inflamación, participando en la activación de IFN- $\gamma$ , fibrogénesis y respuesta antiviral en patologías crónicas del hígado como la infección por VHC [130]; ETS-1 es un factor de transcripción importante durante el desarrollo de las células madre, senescencia celular y tumorigénesis, interviene también en la fibrosis hepática al jugar un papel en la regulación de la expresión de MMP-1 [131]; ELK-1 (proteína con dominio ETC) es un activador transcripcional con importancia también en numerosos procesos celulares, entre ellos en cáncer y regeneración de hepatocitos [132, 133]. Por otro lado, en el caso de rs1059476, en presencia del alelo T, la secuencia es reconocida por el factor YY1, mientras que, en presencia de C, este factor de transcripción deja de reconocer dicha secuencia. Se ha descrito que AURKB interacciona directamente con YY1 y lo fosforila en el residuo de Ser184, localizado en el dominio regulador afectando así a su capacidad de unión al DNA. De esta manera, se ha sugerido que AURKB estaría implicada de forma indirecta en el control transcripcional de

aquellos genes regulados por la unión del factor de transcripción YY1 [134], cuya depleción está asociado con un retraso en la progresión del ciclo y la proliferación celulares, y produce acumulación de células polinucleadas con defectos en la citocinesis [135]. Hasta el momento no hemos confirmado si las secuencias génicas de *AURKB* donde se encuentran los sitios potenciales de unión de estos factores de transcripción (STAT4, ETS-1, ELK-1, YY1) unen estos factores afectando a la regulación de la expresión de *AURKB* u otros genes [136, 137]. Ya que algunos de estos factores participan en el proceso de fibrosis y regeneración hepática, la pérdida de las secuencias de interacción en la secuencia génica de *AURKB* podría indirectamente afectar a procesos relacionados con el desarrollo de fibrosis y/o cirrosis.

Por otro lado, *AURKB* no solo fosforila a la histona H3: otros sustratos son factores de transcripción o importantes reguladores del ciclo celular, como el factor p53 y la proteína RB. *AURKB* fosforila a p53 en múltiples sitios dentro de su dominio de unión al DNA afectando por tanto a su actividad transcripcional [138, 139]. Por lo tanto, sería interesante analizar la fosforilación de estos sustratos e incluso del factor YY1 en presencia de las diferentes variantes alélicas de *AURKB*.

La expresión aberrante de *AURKB* en CHC está asociada con una mayor invasividad y desarrollo de metástasis intrahepáticas, dando lugar a inestabilidad cromosómica y a la desregulación de genes supresores de tumores y oncogenes [74]. Uno de los resultados más relevantes de nuestro estudio es que la *AURKB* es diana del VHC en el proceso de infección. Se sabe que la ausencia o desregulación de la *AURKB* puede dar lugar a inestabilidad cromosómica y a la aparición de aneuploidías [68, 71]. De hecho, nuestros experimentos muestran un aumento de células aneuploides en aquellos cultivos infectados con el VHC. Algunas de estas células podrían sobrevivir generando clones malignos con información genética defectuosa, por lo que una progresión aberrante en mitosis podría ser un paso importante en el proceso de carcinogénesis [7, 140]. Por ello, es posible que la disminución de la actividad de *AURKB* que observamos en presencia de la proteína viral core pueda ser la causa de la alteración en el ciclo celular que se ha observado en la literatura [66, 141]. Cabe mencionar también, que el potencial oncogénico del virus Epstein-Barr se ha relacionado con la actividad de la *AURKB*, aunque los mecanismos moleculares que rigen esta relación son diferentes a los mecanismos identificados hasta ahora en nuestro estudio [142].

Otra diferencia funcional que hemos observado mediante ensayos de inmunofluorescencia (*Figura 45*) es que la sobreexpresión de la variante *AURKB* C/T (alelo T en rs1059476) producía una disminución significativa en el índice de mitosis con respecto al índice de mitosis observado en las células que sobreexpresan la variante polimórfica *AURKB* C/C (alelo C en rs1059476), coincidiendo con las observaciones obtenidas por Petsalaki E et al.,

2011 [82]. Analizamos también el efecto de ambos clones para la posición rs1059476 sobre la proliferación celular, la cual fue similar en presencia de ambos polimorfismos. Curiosamente, aunque la variante AURKB C/T provocó una inhibición mayor en la proliferación en los niveles basales, en células que sobreexpresaban la proteína core junto con dicha variante polimórfica observamos un aumento significativo de la proliferación.

Se ha descrito que el complejo ESCRT-III juega un papel importante en el proceso de abscisión que tiene lugar durante la citocinesis. Una de sus subunidades, la proteína CHMP4C, está implicada en el *timing* de esta abscisión [79, 80]. Petsalaki E et al., 2011 [82] han demostrado cómo la fosforilación de AURKB en la serina 331 es necesaria para la fosforilación de la CHMP4C, evento necesario para la regulación de la abscisión. La depleción de CHMP4C da lugar a células multinucleadas o células poliploides. En nuestras células, la sobreexpresión de las variantes de rs1059476 (AURKB C/C y AURKB C/T) muestran una expresión similar de AURKB en el anillo de abscisión y, aunque hemos demostrado que ambas variantes interaccionan por igual con la proteína CHMP4C, es posible que la variante AURKB C/T haya perdido la capacidad de fosforilar a CHMP4C, produciéndose anomalías durante la citocinesis que pueden explicar la alteración en el índice de mitosis observado en presencia de la misma.

Por otro lado, no sabemos si la proteína core tiene algún efecto en el proceso de citocinesis, pero si se ha descrito que inhibe el punto de control de mitosis reduciendo la transcripción de la proteína RB, aumentando la expresión del factor de transcripción E2F2 y la proteína MAD2 (proteína de deficiencia de arresto mitótico 2) e incrementando el número de células poliploides [143]. Es posible que ambas proteínas, la variante AURKB C/T y la proteína core cooperen contribuyendo de esta forma a la transformación celular, conduciendo al desarrollo de cirrosis y, en última instancia, a CHC. Por otro lado, y ya que hemos observado que AURKB afecta a la infectividad viral, sería interesante determinar si la sobreexpresión de las dos variantes polimórficas para la posición rs1059476 de la AURKB afectan a la infectividad viral de distinta manera al establecer la interacción con core de manera diferencial.

Los experimentos realizados hasta el momento no nos han dado una respuesta concreta sobre el mecanismo de acción del SNPs rs1059476 de AURKB que puedan explicar los resultados obtenidos *in vivo* en pacientes con hepatitis C crónica en diferentes estadios de fibrosis hepática. La generación mediante la técnica de CRISPR/Cas9 de dos líneas celulares completamente idénticas a excepción de la posición rs1059476, así como el análisis por RNA-seq de ambas líneas, podría contribuir a la determinación de la expresión diferencial de genes relacionados con la acción de cada una de estas variantes alélicas.

La aparición de los nuevos tratamientos, antivirales de acción directa o DAAs, ha revolucionado el tratamiento de la hepatitis C crónica, puesto que las tasas de RVS superan el 95% con un tiempo de tratamiento menor y muchos menos efectos secundarios que los tratamientos previos de IFN- $\gamma$  y RBV. En los últimos dos años se ha suscitado una controversia sobre la posibilidad de que el tratamiento antiviral con DAAs se pueda asociar con una mayor incidencia de recidiva tumoral en pacientes con hepatitis C crónica e historia de CHC. Algunos estudios [88, 91] han descrito una elevada tasa de recurrencia de CHC, de en torno a un 25% en pacientes que habían conseguido una cura virológica tras el tratamiento. Los datos son contradictorios, y mientras que algunos grupos sugieren dicha asociación, otros trabajos no llegan a encontrar significación en los resultados. En cualquier caso, el debate ha introducido un factor de prudencia en la prescripción del tratamiento antiviral con DAAs en pacientes con CHC. Poco se sabe sobre las posibles causas que podrían estar relacionadas con una recidiva tumoral tras el tratamiento. La infección por VHC activa la respuesta inmune intrahepática, dando lugar a la expresión de genes estimulados por IFN y a la activación de células NK. Una posible hipótesis para explicar la recurrencia de CHC tras el tratamiento con DAAs es la de que el descenso tan rápido y profundo en la carga viral del VHC inducida por el uso de DAAs va a provocar una desregulación en la respuesta antitumoral, y este cambio inmune podría favorecer el crecimiento de lesiones precancerosas preexistentes [88]; sin embargo, también podría ser consecuencia de alteraciones en el patrón epigenético de las células.

Ya que habíamos observado que el VHC afecta a los niveles globales de H3Ser10ph y a la actividad y expresión de AURKB era interesante analizar si dichos efectos se mantenían tras el tratamiento con los DAAs. Los datos obtenidos a través del estudio del título viral, de la cantidad de RNA intracelular y de la expresión de proteína, en células HuH7.5 infectadas con virus de diferentes *fitness* VHC-0 y VHC-p200 y tratadas en diferentes tiempos con DAAs, muestran que los DAAs son capaces de producir la eliminación del título viral tras 24 horas de tratamiento (96 horas post-infección) y de disminuir la cantidad de RNA intracelular de forma significativa (*Figura 28*). Esto conduce a una reversión de la disminución en los niveles de H3Ser10ph, aunque en el caso de las células infectadas con VHC-p200 no fue completa incluso tras 72 horas de tratamiento, donde se seguían observando RNAs intracelulares remanentes y cantidades apreciables de las proteínas virales core y NS5A (*Figuras 27-29*). Estos resultados estarían en relación con la estabilidad de las proteínas virales [144] más que con la importancia del *fitness* viral en la resistencia a los DAAs. El elevado *fitness* replicativo como nuevo mecanismo de resistencia ha sido demostrado en cultivos celulares [103, 104]. No obstante, en nuestros experimentos, este RNA intracelular se trata de un RNA residual sin capacidad infectiva, tal y como se demuestra tras realizar dos pases seriados adicionales en

nuestro sistema experimental para determinar la infectividad de los RNAs remanentes, observándose como tras la segunda división, estos RNAs desaparecen totalmente sin la necesidad de volver a añadir de nuevo la combinación de DAAs (*Figura 33*). De la misma manera, desaparece también la expresión residual de las proteínas virales NS5A y core.

Cabe destacar que los niveles de H3Ser10ph observados para las células tratadas a las 144 horas son mucho mayores que los niveles basales a las 312 horas. La marca H3Ser10ph es una marca epigenética dinámica que también está asociada a la división celular [77], y sus niveles de expresión pueden verse modificados por el momento del ciclo celular en el que se encuentren las células, ya que la densidad a la que se sembraron las células no fue la misma que la que se utilizó al inicio de los experimentos.

En nuestros experimentos, el tratamiento con DAAs consiguió revertir los niveles de AURKB basales, en concordancia con los resultados observados para la H3Ser10ph (*Figura 30*). Cabe destacar como en presencia de los DAAs, en células sin VHC, se produce un aumento sobre los niveles basales de la quinasa. Este hecho tiene importancia, pues se ha descrito en CHC una sobreexpresión de la AURKB como consecuencia de la hipometilación de su promotor [145], por lo que la desregulación en la expresión del gen AURKB podría tener relación con la tasa de recurrencia de CHC observada en pacientes tratados con DAAs [88].

Se sabe que los altos niveles de HDAC1 se correlacionan con un fenotipo maligno y un peor pronóstico en CHC [50] y que en pacientes con CHC derivado de la infección por VHC, la expresión de genes supresores de tumores está inhibida por metilación del DNA a través de un aumento en la expresión de DNMT1 y DNMT3 mediado por la proteína del core [109]. Por ello, nos planteamos analizar si tras el tratamiento con DAAs se producían alteraciones en estas actividades enzimáticas. Estos experimentos (*Figura 32*) muestran como la infección por el VHC tiende a aumentar la expresión de la HDAC1. De la misma forma observamos una tendencia al aumento en los niveles de DNMT1 y DNMT3A, aumento significativo tan solo en el caso la DNMT3a con el VHC-p0. Curiosamente, el tratamiento con DAAs, en lugar de revertir el efecto provocado por el virus en estos casos, incrementa su efecto sobre las mismas. Para obtener resultados más consistentes, será necesario realizar más experimentos en el futuro, así como analizar los niveles de expresión de estas actividades enzimáticas mediante qRT-PCR. Cabe destacar que el efecto del tratamiento sobre los niveles basales de las actividades enzimáticas AURKB y DNMT1 podrían indicar que el tratamiento con DAAs posee un efecto epigenético *per se* en nuestras células.

En resumen, durante los últimos años se ha demostrado que la epigenética juega un papel muy importante en la regulación de la expresión génica relacionada con la fibrosis y la

carcinogénesis [47]. Nuestros resultados demuestran que la infección por VHC afecta a actividades como la AURKB, que regula importantes procesos durante la división celular y que podría tener un papel adicional en la regulación de genes relacionados con inflamación. La inhibición de la actividad quinasa de AURKB podría ser un mecanismo por el que VHC favorece su infectividad, mientras que AURKB inhibiría este efecto actuando como mecanismo de defensa de la célula huésped frente a la infección viral. En este sentido, variantes genéticas de la AURKB que difieren en su actividad quinasa y en el grado de interacción con la proteína viral core parecen ser importantes en la evolución de la enfermedad hepática observada en pacientes con hepatitis C crónica. El tratamiento de la hepatitis C con DAAs revierte los cambios epigenéticos inducidos por el VHC; sin embargo, los niveles de AURKB podrían elevarse por encima de los niveles basales de las células sin infectar tras el tratamiento con la combinación de DAAs utilizada en nuestro estudio en un sistema *in vitro*, lo cual podría tener relación con la recurrencia de CHC observada en algunos pacientes.



---

# CONCLUSIONES

---

1. El VHC produce cambios postraduccionales en las histonas, concretamente inhibe los niveles globales de fosforilación del residuo de serina 10 en la histona H3, tanto en células humanas de carcinoma hepatocelular HuH7.5 como en cultivos primarios de hepatocitos humanos.
2. La inhibición de esta marca epigenética por el VHC es mediada través de la proteína core, aunque otras proteínas del virus podrían contribuir a este efecto.
3. La infección por el VHC inhibe la actividad quinasa de la AURKB mediante la interacción directa de la región carboxi terminal de la proteína core con el dominio catalítico de la proteína AURKB.
4. La evolución del VHC, reflejada por un mayor tiempo de infección o por la infección con virus de mayor *fitness* replicativo, no solo afecta a la actividad de la AURKB, sino también a sus niveles de expresión.
5. La inhibición de la actividad de AURKB provocada por la infección por el VHC o por la expresión de la proteína core inhiben la expresión de *NF- $\kappa$ B* y *COX-2*, genes implicados en la respuesta proinflamatoria.
6. La inhibición de la actividad de AURKB por la infección por el VHC aumenta la infectividad viral, mientras que su sobreexpresión inhibe la infectividad del VHC.
7. El tratamiento con DAAs, aunque revierte el efecto inhibitorio mediado por VHC en los niveles de H3Ser10ph y en la expresión de la AURKB, aumenta per se los niveles de expresión de AURKB.
8. La presencia del alelo C en la posición rs1059476 y el alelo T en rs2241909 en el gen de AURKB parecen tener un efecto protector en la progresión de la fibrosis hepática de pacientes con hepatitis C crónica. Por el contrario, la presencia del alelo T en la posición rs1059476 está asociado a un estadio de fibrosis mayor y al desarrollo de cirrosis. La presencia del alelo T conlleva una disminución en la actividad quinasa de AURKB y una menor interacción con la proteína viral core.
9. SNPs de AURKB podrían tener valor clínico como marcador pronóstico de progresión de fibrosis sugiriendo un novedoso papel de la AURKB en la progresión de la enfermedad hepática.

---

# **BIBLIOGRAFÍA**

---

1. WHO. *Hepatitis C virus*. [website] 2018.
2. Feinstone, S.M., et al., *Transfusion-associated hepatitis not due to viral hepatitis type A or B*. N Engl J Med, 1975. **292**(15): p. 767-70.
3. Lindenbach, B.D. and C.M. Rice, *Unravelling hepatitis C virus replication from genome to function*. Nature, 2005. **436**(7053): p. 933-8.
4. Hope, R.G. and J. McLauchlan, *Sequence motifs required for lipid droplet association and protein stability are unique to the hepatitis C virus core protein*. J Gen Virol, 2000. **81**(Pt 8): p. 1913-25.
5. Nguyen, H., S. Sankaran, and S. Dandekar, *Hepatitis C virus core protein induces expression of genes regulating immune evasion and anti-apoptosis in hepatocytes*. Virology, 2006. **354**(1): p. 58-68.
6. Lee, S.K., et al., *Interaction of HCV core protein with 14-3-3epsilon protein releases Bax to activate apoptosis*. Biochem Biophys Res Commun, 2007. **352**(3): p. 756-62.
7. Spaziani, A., et al., *Role of p38 MAPK and RNA-dependent protein kinase (PKR) in hepatitis C virus core-dependent nuclear delocalization of cyclin B1*. J Biol Chem, 2006. **281**(16): p. 10983-9.
8. Bai, G., W. Zheng, and W. Ma, *Identification and functional analysis of a core gene module associated with hepatitis C virus-induced human hepatocellular carcinoma progression*. Oncol Lett, 2018. **15**(5): p. 6815-6824.
9. Lindenbach, B.D., et al., *Complete replication of hepatitis C virus in cell culture*. Science, 2005. **309**(5734): p. 623-6.
10. Scheel, T.K. and C.M. Rice, *Understanding the hepatitis C virus life cycle paves the way for highly effective therapies*. Nat Med, 2013. **19**(7): p. 837-49.
11. Tsukiyama-Kohara, K. and M. Kohara, *Hepatitis C Virus: Viral Quasispecies and Genotypes*. Int J Mol Sci, 2017. **19**(1).
12. Moreno, E., et al., *Internal Disequilibria and Phenotypic Diversification during Replication of Hepatitis C Virus in a Noncoevolving Cellular Environment*. J Virol, 2017. **91**(10).
13. Daw, M.A., et al., *Geographic integration of hepatitis C virus: A global threat*. World J Virol, 2016. **5**(4): p. 170-182.
14. Esteban, J.I., S. Sauleda, and J. Quer, *The changing epidemiology of hepatitis C virus infection in Europe*. J Hepatol, 2008. **48**(1): p. 148-62.
15. Axley, P., et al., *Hepatitis C Virus and Hepatocellular Carcinoma: A Narrative Review*. J Clin Transl Hepatol, 2018. **6**(1): p. 79-84.
16. Joo, S.K., et al., *Prospective Comparison of Noninvasive Fibrosis Assessment to Predict Advanced Fibrosis or Cirrhosis in Asian Patients With Hepatitis C*. J Clin Gastroenterol, 2015. **49**(8): p. 697-704.
17. Wynn, T.A. and T.R. Ramalingam, *Mechanisms of fibrosis: therapeutic translation for fibrotic disease*. Nat Med, 2012. **18**(7): p. 1028-40.
18. Chakraborty, J.B., F. Oakley, and M.J. Walsh, *Mechanisms and biomarkers of apoptosis in liver disease and fibrosis*. Int J Hepatol, 2012. **2012**: p. 648915.
19. Marra, F., *Cellular and molecular mechanisms of hepatic fibrogenesis*. Gastroenterol Hepatol, 2007. **30**(Supl 1): p. 99-105.
20. Friedman, S.L., *Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury*. J Biol Chem, 2000. **275**(4): p. 2247-50.
21. Seki, E. and R.F. Schwabe, *Hepatic inflammation and fibrosis: functional links and key pathways*. Hepatology, 2015. **61**(3): p. 1066-79.
22. Poynard, T., P. Bedossa, and P. Opolon, *Natural history of liver fibrosis progression in patients with chronic hepatitis C. The OBSVIRC, METAVIR, CLINIVIR, and DOSVIRC groups*. Lancet, 1997. **349**(9055): p. 825-32.
23. Huang, H., et al., *A 7 gene signature identifies the risk of developing cirrhosis in patients with chronic hepatitis C*. Hepatology, 2007. **46**(2): p. 297-306.

24. Powell, E.E., et al., *Host genetic factors influence disease progression in chronic hepatitis C*. Hepatology, 2000. **31**(4): p. 828-33.
25. Bataller, R., K.E. North, and D.A. Brenner, *Genetic polymorphisms and the progression of liver fibrosis: a critical appraisal*. Hepatology, 2003. **37**(3): p. 493-503.
26. Friedman, S.L., *Mechanisms of hepatic fibrogenesis*. Gastroenterology, 2008. **134**(6): p. 1655-69.
27. Tacke, F. and R. Weiskirchen, *Update on hepatic stellate cells: pathogenic role in liver fibrosis and novel isolation techniques*. Expert Rev Gastroenterol Hepatol, 2012. **6**(1): p. 67-80.
28. Friedman, S.L., *Hepatic fibrosis -- overview*. Toxicology, 2008. **254**(3): p. 120-9.
29. Brenner, D.A., *Molecular pathogenesis of liver fibrosis*. Trans Am Clin Climatol Assoc, 2009. **120**: p. 361-8.
30. Vainer, G.W., E. Pikarsky, and Y. Ben-Neriah, *Contradictory functions of NF-kappaB in liver physiology and cancer*. Cancer Lett, 2008. **267**(2): p. 182-8.
31. Ben-Neriah, Y. and M. Karin, *Inflammation meets cancer, with NF-kappaB as the matchmaker*. Nat Immunol, 2011. **12**(8): p. 715-23.
32. Gilmore, T.D., *Introduction to NF-kappaB: players, pathways, perspectives*. Oncogene, 2006. **25**(51): p. 6680-4.
33. Mohamed, M.R. and G. McFadden, *NFkB inhibitors: strategies from poxviruses*. Cell Cycle, 2009. **8**(19): p. 3125-32.
34. Matsuura, K. and Y. Tanaka, *Host genetic variations associated with disease progression in chronic hepatitis C virus infection*. Hepatol Res, 2018. **48**(2): p. 127-133.
35. Suhail, M., et al., *Association of HCV mutated proteins and host SNPs in the development of hepatocellular carcinoma*. Infect Genet Evol, 2018. **60**: p. 160-172.
36. Lopez-Rodriguez, R., et al., *Polymorphisms in histone deacetylases improve the predictive value of IL-28B for chronic hepatitis C therapy*. Genes Immun, 2013. **14**(5): p. 317-24.
37. Gomaa, A.I., et al., *Hepatocellular carcinoma: epidemiology, risk factors and pathogenesis*. World J Gastroenterol, 2008. **14**(27): p. 4300-8.
38. Moore, P.S. and Y. Chang, *Why do viruses cause cancer? Highlights of the first century of human tumour virology*. Nat Rev Cancer, 2010. **10**(12): p. 878-89.
39. Vescovo, T., et al., *Molecular mechanisms of hepatitis C virus-induced hepatocellular carcinoma*. Clin Microbiol Infect, 2016. **22**(10): p. 853-861.
40. Rance, E., J.E. Tanner, and C. Alfieri, *Inhibition of IkappaB kinase by thalidomide increases hepatitis C virus RNA replication*. J Viral Hepat, 2012. **19**(2): p. e73-80.
41. Aihara, T., et al., *Clonal analysis of regenerative nodules in hepatitis C virus-induced liver cirrhosis*. Gastroenterology, 1994. **107**(6): p. 1805-11.
42. Lai, C.K., et al., *Hepatitis C virus NS3/4A protein interacts with ATM, impairs DNA repair and enhances sensitivity to ionizing radiation*. Virology, 2008. **370**(2): p. 295-309.
43. Nishida, N. and A. Goel, *Genetic and epigenetic signatures in human hepatocellular carcinoma: a systematic review*. Curr Genomics, 2011. **12**(2): p. 130-7.
44. Bonasio, R., S. Tu, and D. Reinberg, *Molecular signals of epigenetic states*. Science, 2010. **330**(6004): p. 612-6.
45. Sawan, C., et al., *Epigenetic drivers and genetic passengers on the road to cancer*. Mutat Res, 2008. **642**(1-2): p. 1-13.
46. Portela, A. and M. Esteller, *Epigenetic modifications and human disease*. Nat Biotechnol, 2010. **28**(10): p. 1057-68.
47. Mann, J., et al., *MeCP2 controls an epigenetic pathway that promotes myofibroblast transdifferentiation and fibrosis*. Gastroenterology, 2010. **138**(2): p. 705-14, 714 e1-4.
48. Hatzia Apostolou, M. and D. Iliopoulos, *Epigenetic aberrations during oncogenesis*. Cell Mol Life Sci, 2011. **68**(10): p. 1681-702.

49. Lambert, M.P., et al., *Aberrant DNA methylation distinguishes hepatocellular carcinoma associated with HBV and HCV infection and alcohol intake*. J Hepatol, 2011. **54**(4): p. 705-15.
50. Chiba, T., et al., *Identification of genes up-regulated by histone deacetylase inhibition with cDNA microarray and exploration of epigenetic alterations on hepatoma cells*. J Hepatol, 2004. **41**(3): p. 436-45.
51. Kondo, Y., et al., *Alterations of DNA methylation and histone modifications contribute to gene silencing in hepatocellular carcinomas*. Hepatol Res, 2007. **37**(11): p. 974-83.
52. Yao, J.Y., et al., *H3K27 trimethylation is an early epigenetic event of p16INK4a silencing for regaining tumorigenesis in fusion reprogrammed hepatoma cells*. J Biol Chem, 2010. **285**(24): p. 18828-37.
53. Cai, M.Y., et al., *High expression of H3K27me3 in human hepatocellular carcinomas correlates closely with vascular invasion and predicts worse prognosis in patients*. Mol Med, 2011. **17**(1-2): p. 12-20.
54. Fraga, M.F. and M. Esteller, *Towards the human cancer epigenome: a first draft of histone modifications*. Cell Cycle, 2005. **4**(10): p. 1377-81.
55. Sistayanarain, A., et al., *Expression of Aurora-B kinase and phosphorylated histone H3 in hepatocellular carcinoma*. Anticancer Res, 2006. **26**(5A): p. 3585-93.
56. Wu, L.M., et al., *Identification of histone deacetylase 3 as a biomarker for tumor recurrence following liver transplantation in HBV-associated hepatocellular carcinoma*. PLoS One, 2010. **5**(12): p. e14460.
57. Magerl, C., et al., *H3K4 dimethylation in hepatocellular carcinoma is rare compared with other hepatobiliary and gastrointestinal carcinomas and correlates with expression of the methylase Ash2 and the demethylase LSD1*. Hum Pathol, 2010. **41**(2): p. 181-9.
58. Hung, S.Y., et al., *Histone-modifying genes as biomarkers in hepatocellular carcinoma*. Int J Clin Exp Pathol, 2014. **7**(5): p. 2496-507.
59. Sudo, T., et al., *Clinicopathological significance of EZH2 mRNA expression in patients with hepatocellular carcinoma*. Br J Cancer, 2005. **92**(9): p. 1754-8.
60. Cheng, A.S., et al., *EZH2-mediated concordant repression of Wnt antagonists promotes beta-catenin-dependent hepatocarcinogenesis*. Cancer Res, 2011. **71**(11): p. 4028-39.
61. Pogribny, I.P. and I. Rusyn, *Role of epigenetic aberrations in the development and progression of human hepatocellular carcinoma*. Cancer Lett, 2014. **342**(2): p. 223-30.
62. Hamamoto, R., et al., *SMYD3 encodes a histone methyltransferase involved in the proliferation of cancer cells*. Nat Cell Biol, 2004. **6**(8): p. 731-40.
63. Moran-Salvador, E. and J. Mann, *Epigenetics and Liver Fibrosis*. Cell Mol Gastroenterol Hepatol, 2017. **4**(1): p. 125-134.
64. Wilson, C.L., D.A. Mann, and L.A. Borthwick, *Epigenetic reprogramming in liver fibrosis and cancer*. Adv Drug Deliv Rev, 2017. **121**: p. 124-132.
65. Duong, F.H., et al., *Hepatitis C virus-induced up-regulation of protein phosphatase 2A inhibits histone modification and DNA damage repair*. Hepatology, 2010. **51**(3): p. 741-51.
66. Kannan, R.P., et al., *Hepatitis C virus infection causes cell cycle arrest at the level of initiation of mitosis*. J Virol, 2011. **85**(16): p. 7989-8001.
67. Malumbres, M. and M. Barbacid, *Cell cycle kinases in cancer*. Curr Opin Genet Dev, 2007. **17**(1): p. 60-5.
68. Tchatchou, S., et al., *Aurora kinases A and B and familial breast cancer risk*. Cancer Lett, 2007. **247**(2): p. 266-72.
69. Carmena, M. and W.C. Earnshaw, *The cellular geography of aurora kinases*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2003. **4**(11): p. 842-54.
70. Fu, J., et al., *Roles of Aurora kinases in mitosis and tumorigenesis*. Mol Cancer Res, 2007. **5**(1): p. 1-10.

71. Giet, R., C. Petretti, and C. Prigent, *Aurora kinases, aneuploidy and cancer, a coincidence or a real link?* Trends Cell Biol, 2005. **15**(5): p. 241-50.
72. Katayama, H. and S. Sen, *Aurora kinase inhibitors as anticancer molecules*. Biochim Biophys Acta, 2010. **1799**(10-12): p. 829-39.
73. Tang, A., et al., *Aurora kinases: novel therapy targets in cancers*. Oncotarget, 2017. **8**(14): p. 23937-23954.
74. Lin, Z.Z., et al., *Significance of Aurora B overexpression in hepatocellular carcinoma. Aurora B Overexpression in HCC*. BMC Cancer, 2010. **10**: p. 461.
75. Sugiyama, K., et al., *Aurora-B associated protein phosphatases as negative regulators of kinase activation*. Oncogene, 2002. **21**(20): p. 3103-11.
76. Adams, R.R., M. Carmena, and W.C. Earnshaw, *Chromosomal passengers and the (aurora) ABCs of mitosis*. Trends Cell Biol, 2001. **11**(2): p. 49-54.
77. Goto, H., et al., *Aurora-B phosphorylates Histone H3 at serine28 with regard to the mitotic chromosome condensation*. Genes Cells, 2002. **7**(1): p. 11-7.
78. Andrews, P.D., et al., *Mitotic mechanics: the auroras come into view*. Curr Opin Cell Biol, 2003. **15**(6): p. 672-83.
79. Thoresen, S.B., et al., *ANCHR mediates Aurora-B-dependent abscission checkpoint control through retention of VPS4*. Nat Cell Biol, 2014. **16**(6): p. 550-60.
80. Carlton, J.G., et al., *ESCRT-III governs the Aurora B-mediated abscission checkpoint through CHMP4C*. Science, 2012. **336**(6078): p. 220-5.
81. Yu, H., *Chk1: a double agent in cell cycle checkpoints*. Dev Cell, 2007. **12**(2): p. 167-8.
82. Petsalaki, E., et al., *Phosphorylation at serine 331 is required for Aurora B activation*. J Cell Biol, 2011. **195**(3): p. 449-66.
83. Petsalaki, E. and G. Zachos, *Clks 1, 2 and 4 prevent chromatin breakage by regulating the Aurora B-dependent abscission checkpoint*. Nat Commun, 2016. **7**: p. 11451.
84. Pohl, A., et al., *Pharmacogenetic profiling of Aurora kinase B is associated with overall survival in metastatic colorectal cancer*. Pharmacogenomics J, 2011. **11**(2): p. 93-9.
85. Vachon, C.M., et al., *No evidence for association of inherited variation in genes involved in mitosis and percent mammographic density*. Breast Cancer Res, 2012. **14**(1): p. R7.
86. Mesic, A., et al., *Single nucleotide polymorphisms rs911160 in AURKA and rs2289590 in AURKB mitotic checkpoint genes contribute to gastric cancer susceptibility*. Environ Mol Mutagen, 2017. **58**(9): p. 701-711.
87. Mesic, A., et al., *Association of the AURKA and AURKC gene polymorphisms with an increased risk of gastric cancer*. IUBMB Life, 2016. **68**(8): p. 634-44.
88. Roche, B., et al., *The impact of treatment of hepatitis C with DAAs on the occurrence of HCC*. Liver Int, 2018. **38 Suppl 1**: p. 139-145.
89. Hytioglou, P. and N.D. Theise, *Regression of human cirrhosis: an update, 18 years after the pioneering article by Wanless et al*. Virchows Arch, 2018. **473**(1): p. 15-22.
90. Zoubek, M.E., C. Trautwein, and P. Strnad, *Reversal of liver fibrosis: From fiction to reality*. Best Pract Res Clin Gastroenterol, 2017. **31**(2): p. 129-141.
91. Reig, M., et al., *Unexpected high rate of early tumor recurrence in patients with HCV-related HCC undergoing interferon-free therapy*. J Hepatol, 2016. **65**(4): p. 719-726.
92. Ostuni, R., et al., *Latent enhancers activated by stimulation in differentiated cells*. Cell, 2013. **152**(1-2): p. 157-71.
93. Bevington, S.L., P. Cauchy, and P.N. Cockerill, *Chromatin priming elements establish immunological memory in T cells without activating transcription: T cell memory is maintained by DNA elements which stably prime inducible genes without activating steady state transcription*. Bioessays, 2017. **39**(2).
94. Duque, J., et al., *Up-regulation of cyclooxygenase-2 by interleukin-1beta in colon carcinoma cells*. Cell Signal, 2006. **18**(8): p. 1262-9.
95. Pichard, L., et al., *Human hepatocyte culture*. Methods Mol Biol, 2006. **320**: p. 283-93.



96. Marukian, S., et al., *Cell culture-produced hepatitis C virus does not infect peripheral blood mononuclear cells*. Hepatology, 2008. **48**(6): p. 1843-50.
97. Giulietti, A., et al., *An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression*. Methods, 2001. **25**(4): p. 386-401.
98. Messeguer, X., et al., *PROMO: detection of known transcription regulatory elements using species-tailored searches*. Bioinformatics, 2002. **18**(2): p. 333-4.
99. Farre, D., et al., *Identification of patterns in biological sequences at the ALGGEN server: PROMO and MALGEN*. Nucleic Acids Res, 2003. **31**(13): p. 3651-3.
100. Hengeveld, R.C., et al., *Development of a chemical genetic approach for human aurora B kinase identifies novel substrates of the chromosomal passenger complex*. Mol Cell Proteomics, 2012. **11**(5): p. 47-59.
101. Sabbattini, P., et al., *A novel role for the Aurora B kinase in epigenetic marking of silent chromatin in differentiated postmitotic cells*. EMBO J, 2007. **26**(22): p. 4657-69.
102. Tardaguila, M., E. Gonzalez-Gugel, and A. Sanchez-Pacheco, *Aurora kinase B activity is modulated by thyroid hormone during transcriptional activation of pituitary genes*. Mol Endocrinol, 2011. **25**(3): p. 385-93.
103. Sheldon, J., et al., *Increased replicative fitness can lead to decreased drug sensitivity of hepatitis C virus*. J Virol, 2014. **88**(20): p. 12098-111.
104. Gallego, I., et al., *Barrier-Independent, Fitness-Associated Differences in Sofosbuvir Efficacy against Hepatitis C Virus*. Antimicrob Agents Chemother, 2016. **60**(6): p. 3786-93.
105. Liu, K.Y., L.T. Wang, and S.H. Hsu, *Modification of Epigenetic Histone Acetylation in Hepatocellular Carcinoma*. Cancers (Basel), 2018. **10**(1).
106. Park, H.J., E. Yu, and Y.H. Shim, *DNA methyltransferase expression and DNA hypermethylation in human hepatocellular carcinoma*. Cancer Lett, 2006. **233**(2): p. 271-8.
107. Saito, Y., et al., *Overexpression of a splice variant of DNA methyltransferase 3b, DNMT3b4, associated with DNA hypomethylation on pericentromeric satellite regions during human hepatocarcinogenesis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(15): p. 10060-5.
108. Saito, Y., et al., *Increased protein expression of DNA methyltransferase (DNMT) 1 is significantly correlated with the malignant potential and poor prognosis of human hepatocellular carcinomas*. Int J Cancer, 2003. **105**(4): p. 527-32.
109. Benegiamo, G., et al., *DNA methyltransferases 1 and 3b expression in Huh-7 cells expressing HCV core protein of different genotypes*. Dig Dis Sci, 2012. **57**(6): p. 1598-603.
110. Quan, H., et al., *Hepatitis C virus core protein epigenetically silences SFRP1 and enhances HCC aggressiveness by inducing epithelial-mesenchymal transition*. Oncogene, 2014. **33**(22): p. 2826-35.
111. Conti, F., et al., *Early occurrence and recurrence of hepatocellular carcinoma in HCV-related cirrhosis treated with direct-acting antivirals*. J Hepatol, 2016. **65**(4): p. 727-733.
112. UCSC. UCSC Genome Browser on Human Dec. 2013 (GRCh38/hg38) Assembly - AURKB. Available from: [https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgTracks?db=hg38&lastVirtModeType=default&lastVirtModeExtraState=&virtModeType=default&virtMode=0&nonVirtPosition=&position=chr17%3A8204773%2D8210598&hgid=685586367\\_9iqkUxCTxPtNA376pG7eOyl5aktP](https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgTracks?db=hg38&lastVirtModeType=default&lastVirtModeExtraState=&virtModeType=default&virtMode=0&nonVirtPosition=&position=chr17%3A8204773%2D8210598&hgid=685586367_9iqkUxCTxPtNA376pG7eOyl5aktP).
113. Nigg, E.A., *Mitotic kinases as regulators of cell division and its checkpoints*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2001. **2**(1): p. 21-32.
114. Ensembl. [cited 2018 July 2018]; Available from: [https://www.ensembl.org/Homo\\_sapiens/Gene/Summary?db=core;g=ENSG00000178999;r=17:8204733-8210600](https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Summary?db=core;g=ENSG00000178999;r=17:8204733-8210600).
115. D'Avino, P.P. and L. Capalbo, *New Auroras on the Roles of the Chromosomal Passenger Complex in Cytokinesis: Implications for Cancer Therapies*. Front Oncol, 2015. **5**: p. 221.



116. Chen, H.S., F. Lu, and P.M. Lieberman, *Epigenetic regulation of EBV and KSHV latency*. Curr Opin Virol, 2013. **3**(3): p. 251-9.
117. Siddiqui, N.N., et al., *DNA methyltransferase 1, 3a, and 3b expression in hepatitis C associated human hepatocellular carcinoma and their clinicopathological association*. Tumour Biol, 2016. **37**(8): p. 10487-97.
118. Shimakami, T., et al., *Stabilization of hepatitis C virus RNA by an Ago2-miR-122 complex*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(3): p. 941-6.
119. Zachos, G., et al., *Chk1 is required for spindle checkpoint function*. Dev Cell, 2007. **12**(2): p. 247-60.
120. Bernsmeier, C., et al., *Virus-induced over-expression of protein phosphatase 2A inhibits insulin signalling in chronic hepatitis C*. J Hepatol, 2008. **49**(3): p. 429-40.
121. Wang, Y., et al., *Hepatitis C virus NS5B protein delays s phase progression in human hepatocyte-derived cells by relocalizing cyclin-dependent kinase 2-interacting protein (CINP)*. J Biol Chem, 2011. **286**(30): p. 26603-15.
122. Yasui, Y., et al., *Autophosphorylation of a newly identified site of Aurora-B is indispensable for cytokinesis*. J Biol Chem, 2004. **279**(13): p. 12997-3003.
123. Park, J., et al., *Hepatitis C virus infection enhances TNFalpha-induced cell death via suppression of NF-kappaB*. Hepatology, 2012. **56**(3): p. 831-40.
124. Fischer, R., T. Baumert, and H.E. Blum, *Hepatitis C virus infection and apoptosis*. World J Gastroenterol, 2007. **13**(36): p. 4865-72.
125. Li, Q., et al., *Hepatitis C virus infection activates an innate pathway involving IKK-alpha in lipogenesis and viral assembly*. Nat Med, 2013. **19**(6): p. 722-9.
126. Mazzer, L., et al., *Aurora and IKK kinases cooperatively interact to protect multiple myeloma cells from Apo2L/TRAIL*. Blood, 2013. **122**(15): p. 2641-53.
127. Chen, C., et al., *DNA methyltransferases 1 and 3B are required for hepatitis C virus infection in cell culture*. Virology, 2013. **441**(1): p. 57-65.
128. Davey, N.E., G. Trave, and T.J. Gibson, *How viruses hijack cell regulation*. Trends Biochem Sci, 2011. **36**(3): p. 159-69.
129. Hirota, T., et al., *Histone H3 serine 10 phosphorylation by Aurora B causes HP1 dissociation from heterochromatin*. Nature, 2005. **438**(7071): p. 1176-80.
130. Wang, Y., A. Qu, and H. Wang, *Signal transducer and activator of transcription 4 in liver diseases*. Int J Biol Sci, 2015. **11**(4): p. 448-55.
131. Liu, T., et al., *Matrix metalloproteinase-1 induction by diethyldithiocarbamate is regulated via Akt and ERK/miR222/ETS-1 pathways in hepatic stellate cells*. Biosci Rep, 2016. **36**(4).
132. Fukuda, K., et al., *Hepatitis C virus core protein enhances the activation of the transcription factor, Elk1, in response to mitogenic stimuli*. Hepatology, 2001. **33**(1): p. 159-65.
133. Wuestefeld, T., et al., *A Direct in vivo RNAi screen identifies MKK4 as a key regulator of liver regeneration*. Cell, 2013. **153**(2): p. 389-401.
134. Kassardjian, A., et al., *The transcription factor YY1 is a novel substrate for Aurora B kinase at G2/M transition of the cell cycle*. PLoS One, 2012. **7**(11): p. e50645.
135. Gordon, S., et al., *Transcription factor YY1: structure, function, and therapeutic implications in cancer biology*. Oncogene, 2006. **25**(8): p. 1125-42.
136. Sauna, Z.E. and C. Kimchi-Sarfaty, *Understanding the contribution of synonymous mutations to human disease*. Nat Rev Genet, 2011. **12**(10): p. 683-91.
137. Brest, P., et al., *A synonymous variant in IRGM alters a binding site for miR-196 and causes deregulation of IRGM-dependent xenophagy in Crohn's disease*. Nat Genet, 2011. **43**(3): p. 242-5.
138. Wu, L., C.A. Ma, and A. Jain, *When Aurora B met p53: newly revealed regulatory phosphorylation in an old protein*. Cell Cycle, 2011. **10**(2): p. 171-2.

139. Gully, C.P., et al., *Aurora B kinase phosphorylates and instigates degradation of p53*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(24): p. E1513-22.
140. Tanaka, S. and S. Aii, *Medical treatments: in association or alone, their role and their future perspectives: novel molecular-targeted therapy for hepatocellular carcinoma*. J Hepatobiliary Pancreat Sci, 2010. **17**(4): p. 413-9.
141. Walters, K.A., et al., *Genomic analysis reveals a potential role for cell cycle perturbation in HCV-mediated apoptosis of cultured hepatocytes*. PLoS Pathog, 2009. **5**(1): p. e1000269.
142. Jha, H.C., et al., *EBNA3C-mediated regulation of aurora kinase B contributes to Epstein-Barr virus-induced B-cell proliferation through modulation of the activities of the retinoblastoma protein and apoptotic caspases*. J Virol, 2013. **87**(22): p. 12121-38.
143. Machida, K., et al., *Hepatitis C virus causes uncoupling of mitotic checkpoint and chromosomal polyploidy through the Rb pathway*. J Virol, 2009. **83**(23): p. 12590-600.
144. Afzal, M.S., et al., *Regulation of core expression during the hepatitis C virus life cycle*. J Gen Virol, 2015. **96**(Pt 2): p. 311-21.
145. Sang, L., et al., *Bioinformatics analysis of aberrantly methylated-differentially expressed genes and pathways in hepatocellular carcinoma*. World J Gastroenterol, 2018. **24**(24): p. 2605-2616.

---

# ANEXO

---

### **PUBLICACIONES DERIVADAS DEL PRESENTE TRABAJO:**

1. Madejón A, Sheldon J, Francisco-Recuero I, Perales C, Domínguez-Beato M, Lasa M, Sánchez-Perez I, Muntané J, Domingo E, García-Samaniego J, Sánchez-Pacheco A. ***Hepatitis C virus-mediated Aurora B kinase inhibition modulates inflammatory pathway and viral infectivity.*** Journal of Hepatology 63 (2015), pp. 312-319.

### **OTRAS PUBLICACIONES EN LAS QUE LA DOCTORANDA HA PARTICIPADO DURANTE EL TRANCURSO DE LA TESIS:**

1. Aurora Sánchez-Pacheco, Antonio Madejón, Irene Francisco-Recuero, Javier García-Samaniego. ***Hepatitis C Virus and Epigenetic Modifications*** (Gonorrhea and Viral Hepatitis: Risk Factors, Clinical Management and Potential Complications). *Nova Science Publishers, Inc. USA (2014). Pág. 43-65. ISBN: 978-1-63463-008-5*
2. Aurora Sánchez-Pacheco, Irene Francisco-Recuero, Irene Barguilla. ***Nutrigenómica aplicada al cáncer*** (Alimentación, nutrición y cáncer: prevención y tratamiento). *UNED, España (2016). ISBN: 978-84-362-6976-5.*



# Hepatitis C virus-mediated Aurora B kinase inhibition modulates inflammatory pathway and viral infectivity

Antonio Madejón<sup>3,4,†</sup>, Julie Sheldon<sup>2,†</sup>, Irene Francisco-Recuero<sup>1</sup>, Celia Perales<sup>2,4</sup>,  
Mariela Domínguez-Beato<sup>1</sup>, Marina Lasa<sup>1</sup>, Isabel Sánchez-Perez<sup>1</sup>, Jordi Muntané<sup>5</sup>,  
Esteban Domingo<sup>2,4</sup>, Javier García-Samaniego<sup>3,4</sup>, Aurora Sánchez-Pacheco<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Bioquímica, UAM, Instituto de Investigaciones Biomédicas Alberto Sols, CSIC-UAM, Arturo Duperier 4, 28029 Madrid, Spain;

<sup>2</sup>Centro de Biología Molecular "Severo Ochoa" (CSIC-UAM), Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Campus de Cantoblanco, 28049 Madrid, Spain; <sup>3</sup>Hepatology Unit Hospital Universitario La Paz/Carlos III, Instituto de Investigación Sanitaria "La Paz", Madrid, Spain;

<sup>4</sup>Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBERehd), Instituto Salud Carlos III, Madrid, Spain;

<sup>5</sup>Oncology Surgery, Cell Therapy and Transplant Organs, Institute of Biomedicine of Seville (IBiS)-Virgen del Rocio University Hospital (CSIC), University of Seville, Seville, Spain

**Background & Aims:** Chronic hepatitis C is a leading cause of chronic liver disease, cirrhosis and hepatocellular carcinoma. DNA methylation and histone covalent modifications constitute crucial mechanisms of genomic instability in human disease, including liver fibrosis and hepatocellular carcinoma. The present work studies the consequences of HCV-induced histone modifications in early stages of infection.

**Methods:** Human primary hepatocytes and HuH7.5 cells were transiently transfected with the core protein of hepatitis C virus (HCV) genotypes 1a, 1b, and 2a. Infectious genotype 2a HCV in culture was also used.

**Results:** We show that HCV and core protein inhibit the phosphorylation of Serine 10 in histone 3. The inhibition is due to the direct interaction between HCV core and Aurora B kinase (AURKB) that results in a decrease of AURKB activity. HCV and core significantly downregulate NF- $\kappa$ B and COX-2 transcription, two proteins with anti-apoptotic and proliferative effects implicated in the control of the inflammatory response. AURKB depletion reduced HCV and core repression of NF- $\kappa$ B and COX-2 gene transcription and AURKB overexpression reversed the viral effect. AURKB abrogation increased HCV specific infectivity which was decreased when AURKB was overexpressed.

**Conclusions:** The core-mediated decrease of AURKB activity may play a role in the inflammatory pathway during the initial steps of viral infection, while ensuring HCV infectivity.

© 2015 European Association for the Study of the Liver. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

**Keywords:** Hepatitis C; Inflammation; NF- $\kappa$ B; COX-2; Histone modifications.

Received 31 July 2014; received in revised form 16 February 2015; accepted 23 February 2015; available online 27 February 2015

\* Corresponding author. Address: Departamento de Bioquímica-Instituto de Investigaciones Biomédicas A. Sols (UAM-CSIC), Arturo Duperier 4, 28029 Madrid, Spain. Tel.: +34 15854418; fax: +34 15854401.

E-mail address: [asanchez@iib.uam.es](mailto:asanchez@iib.uam.es) (A. Sánchez-Pacheco).

<sup>†</sup> These authors contributed equally to this work.

**Abbreviations:** HCV, hepatitis C virus; HCC, hepatocellular carcinoma; AURKB, Aurora B kinase; PP2, protein phosphatase 2; Chk1, checkpoint kinase 1; NF- $\kappa$ B, nuclear factor- $\kappa$ B; COX-2, cyclooxygenase-2.

## Introduction

Chronic hepatitis C virus (HCV) infection is a leading cause of progression of liver fibrosis, cirrhosis and hepatocellular carcinoma (HCC) by mechanisms which are not fully understood. In recent years the role of epigenetic processes on gene expression related to fibrosis and carcinogenesis has been demonstrated [4,20,23,36]. These epigenetic changes are regulated by enzymatic activities such as DNA methyltransferases, histone acetyltransferases, methylases and kinases, among others [29].

Ser10 and Ser28 phosphorylation in histone H3 is induced by Aurora B kinase (AURKB) [13]. This kinase belongs to the Aurora family of Ser/Thr kinases, and defects in function and expression have been linked to tumorigenesis [11]. AURKB, together with Aurora A kinase (AURKA) have been found to be overexpressed in human cancers, including HCC, and several AURK inhibitors have been designed as potential anticancer molecules [19].

The role of AURKB in HCV-related disease progression has not been investigated. HCV infection has been shown to cause overexpression of protein phosphatase 2A (PP2A) [8], which potentially can produce acetylation and methylation of histone 4 and phosphorylation of histone 2AX [9]. A reduction of Ser10 histone H3 phosphorylation associated with cell cycle arrest has been reported in hepatoma cells infected with HCV [18], although the underlying mechanism has not been described.

The HCV core protein is the major component of the viral nucleocapsid and has been implicated in multiple functions, such as cellular proliferation and transformation, transcription regulation, cell cycle modulation, and apoptosis [26]. Therefore, it is a good candidate to mediate epigenetic changes induced by HCV infection.

Herein we report the impact of HCV in some epigenetic modifications of primary hepatocytes and hepatoma cells in culture. We show that inhibition of AURKB activity by HCV infection is associated with histone modifications and that the viral core protein is sufficient to trigger this effect. At the same time, HCV regulates pro-inflammatory response through the downregulation of



ELSEVIER

nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) and cyclooxygenase-2 (COX-2) gene expression. Both proteins are critical mediators of inducible gene transcription involved in innate immunity [1]. Implications for liver disease and HCV survival are discussed.

## Materials and methods

### Cell culture and transfections

Human primary hepatocytes were prepared from liver biopsies of two patients submitted to a surgical resection for liver tumors (with the patients' written consent). Hepatocytes were isolated using the two step collagenase procedure [32]. HuH7.5 cells were cultured as previously described [30]. The complete coding regions of the core and NS5A HCV proteins of genotypes 1a, 1b, and 2a (clones H77, Con1, and Jc1 respectively, courtesy of Professor Charles Rice) were transferred to the pCMV expression vector (Clontech Laboratories, Inc); the integrity and orientation of the coding regions was confirmed by sequence analysis.

Cells were transfected using FuGeneHD (Promega). When indicated, the AURKB inhibitor ZM-447439 (2  $\mu$ M) (Tocris) was added 30 min after transfection. The following amounts of plasmid were used per well (60 mm): NF- $\kappa$ B-luc (0.25  $\mu$ g) or COX-2-luc (0.25  $\mu$ g) + pTK-Ren (renilla) (0.01  $\mu$ g), together with pCMV0 (1  $\mu$ g) or pCMV-core (1a, 1b, or 2a) (1  $\mu$ g) or pCMV-NS5A (1a, 1b, or 2a) (1  $\mu$ g). pcDNA3-FLAG-AURKB (1–5  $\mu$ g) were used in the indicated experiments. Protein expression was monitored by Western blot assays and quantitated by densitometry. Luciferase and renilla activities were assayed with a dual luciferase assay system after 72 h of transfection (Promega). Most of the experiments were repeated at least three times in duplicate, and all data are presented as the mean of at least six determinations  $\pm$  S.D.

### HCV infection

The HCVcc virus stock was produced in HuH7.5 cells as previously described [30,33]. HuH7.5 reporter cells were infected with HCVcc at a multiplicity of infection (MOI) of 0.03 TCID<sub>50</sub>/cell. Extracellular virus titers were determined as described [30]. All the experiments were processed 72 h after HCV infection, unless indicated in the figure legends. Under these conditions 80–90% of the cells were infected as determined by live imaging [16].

### RNA interference

AURKB siRNAs (50 or 100 nM, Dharmacon) were transfected with FuGeneHD (Promega). At 72 h post-transfection, the cells were harvested. AURKB mRNA and protein levels were determined by qRT-PCR and Western blot, respectively.

### Immunoprecipitation and Western blot

Western blot assays were performed as previously described [38]. The following antibodies were used: anti-H3Ser10ph, anti-H3 (Upstate Biotechnology), anti-AURKB (Abcam), anti-phosphorylated Aurora-BpT232 (Rockland), anti-H3K9me2, anti-H3K9me3, anti-H3K4me3 (Upstate Biotechnology) anti-Hep cAg (1868) (Santa Cruz Biotechnologies, CA), anti-NS5A (9E10, courtesy of Professor Charles Rice) and anti-HA (Sigma). 5–30  $\mu$ g of total protein was used in Western blot assays depending on the antibody used.  $\beta$ -actin, GAPDH or H3 levels were used as loading control in Western blot assays.

For IP, HuH7.5 cells were transfected with core and 72 h later, cells were lysed in buffer B [38]. 2 mg of cell extracts were pre-cleared for 2 h with 40  $\mu$ l of protein A agarose beads and incubated overnight with 60  $\mu$ l of protein A agarose beads previously coupled with 2  $\mu$ g of the specific antibody or rabbit IgG. The immunoprecipitated proteins and 20  $\mu$ g of total extract (input control) were analysed by Western blot using the antibodies indicated in each figure.

### Chromatin immunoprecipitation

Chromatin IP (ChIP) was performed as described in The Chromatin Immunoprecipitation Assay kit (Upstate, Cat. 17-295). Sonication was carried out using a Bioruptor UCD-200TM (Diagenode) following the manufacturer's instructions. IP was quantified by real-time PCR and the Ct values of the target

sequences in the immunoprecipitate were calculated in relation to the input (INP) fractions by the comparative Ct method using the equation  $2^{-[Ct(IP) - Ct(INP)]}$ . Primers are described in [Supplementary Table 1](#).

### Metabolic activity and cell viability studies

At 24, 48, 96, and 144 h post-infection cells were incubated with MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) (final concentration 0.2 mg/ml) at 37 °C for 3 h and subsequently with 100  $\mu$ l of DMSO. Absorbance was measured at 570 nm. Cell proliferation was determined by counting cells with 0.4% Trypan blue/PBS solution (1:1).

### Immunofluorescence and microscopy

Fixed and permeabilized HuH7.5 cells were incubated with anti-H3Ser10ph (1:100), then with goat-anti-rabbit IgG Alexa-Fluor 488 or 546 (1:200), respectively, for 1 h at 37 °C. Images were captured with Axiophot (Zeiss) microscope with a Plan-NEOFLUAR 20x. Images were processed with ZEN 2011 software (Zeiss) and Adobe Photoshop CS.

### GST constructions and pull-down assays

pGEX-4T1-AURKB/1-75 and pGEX-4T1-AURKB/1-250 vectors were generated by PCR from pGEX-4T1-AURKB using primers indicated in [Supplementary Table 1](#). The PCR products were inserted into pGEX-4T1 vectors. The core coding region was inserted into the pcDNA3.1HisA vector (Invitrogen) to produce pcDNA3.1HisA-core. The pcDNA3.1HisA-core/1-122 vector was generated by PCR from pcDNA3.1HisA-core using primers indicated in [Supplementary Table 1](#). Recombinant proteins were purified on glutathione-sepharose resin and analysed by SDS-PAGE. <sup>35</sup>S-labelled core and core 1/122 were *in vitro* translated with TNT T7 Quick Kit and used in pull-down assays with 0.5  $\mu$ g of GST0 or GST-fused proteins as previously described [38].

### Quantitative RT-PCR (qRT-PCR) of cellular mRNAs and viral RNA

DNase-treated RNA (2  $\mu$ g), isolated from hepatoma cells using TRI Reagent (Sigma), was reverse transcribed with the SuperScript™ First Strand Synthesis System (Invitrogen Life Technologies) according to the manufacturer's instructions. The resulting cDNA template (2  $\mu$ l) was amplified using the 2x Brilliant SYBR Green QPCR Kit (Stratagene). Experiments were carried out in triplicate. Each value was normalized against the GAPDH gene and expressed as relative RNA abundance over time zero. HCV qRT-PCR was previously described [30]. Primers are described in [Supplementary Table 1](#).

### Statistical analysis

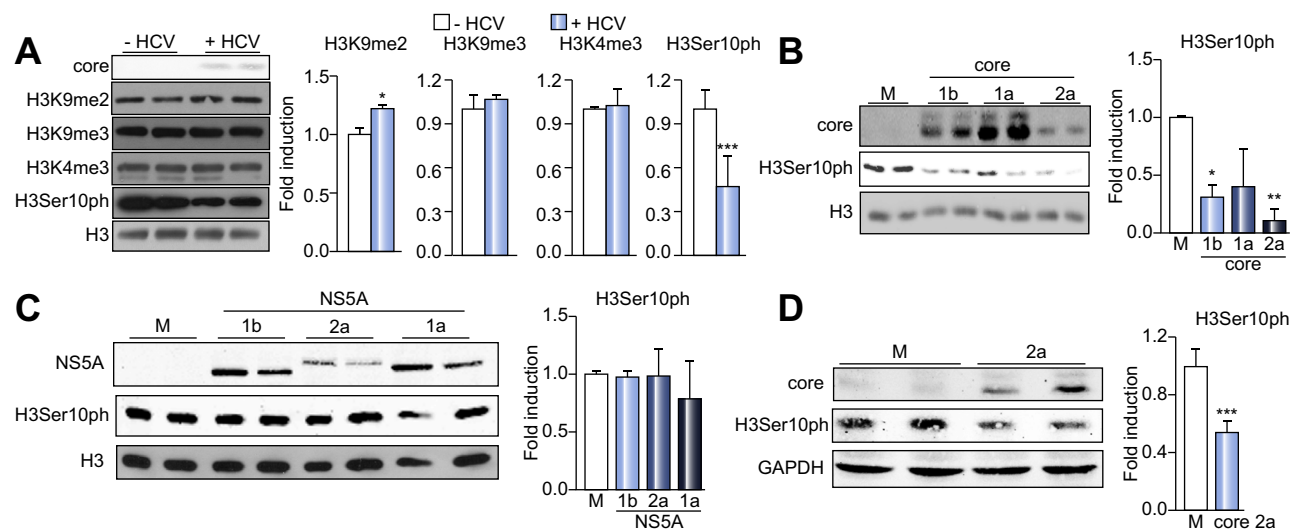
Student's t and Wilcoxon test were performed using the SSC-Stat software (version 2.18; University of Reading, Reading, UK) and the IBM SPSS Statistic 19 software. The statistical significance of differences between groups was expressed by asterisks or hashes (\*, #, p < 0.05; \*\*, ##, p < 0.01; \*\*\*, ###, p < 0.001).

## Results

### HCV effect on histone modifications

To determine the possible effect of HCV infection in epigenetic modifications of the host cells, we first examined histone covalent modifications in human hepatoma HuH7.5 cells infected with HCV. HCV infection markedly decreased phosphorylation of Serine 10 in histone H3 (H3Ser10ph), and slightly increased the di-methylation of Lysine 9 in H3 (H3K9me2); the other epigenetic markers analysed were not altered ([Fig. 1A](#)). To investigate whether the H3Ser10 phosphorylation was mediated by HCV proteins, core and NS5A were expressed in HuH7.5 cells. Expression of the core protein from HCV genotypes 1a, 1b, and 2a ([Fig. 1B](#)) inhibited H3Ser10ph, although the decrease was only

## Research Article



**Fig. 1. HCV infection decreases H3Ser10 phosphorylation.** (A) Western blot assays of the levels of H3Ser10ph, H3K9me2, H3K9me3, H3K4me3 and core in HCV infected cells. H3 antibody represents the loading control. (B) After pCMV0 (M) or pCMV-core expression of different genotypes in HuH7.5 cells, H3Ser10ph levels and core protein expression were detected by specific antibodies. (C) H3Ser10ph and NS5A levels after expression of CMV-NS5A of different genotypes. (D) H3Ser10ph and core expression tested in human hepatocytes transfected with core. Band intensities from three different assays were quantified and represented as fold induction relative to the control. Protein extracts were prepared 72 h after HCV infection or core transfection.

statistically significant for core 1b and core 2a expression. Expression of the NS5A protein from the same genotypes did not alter H3Ser10ph (Fig. 1C). Levels of expression of core and H3Ser10ph in HCV infected and in core 2a transfected HuH7.5 cells were also tested (Supplementary Fig. 1A). In both cases core expression was sufficient to reduce H3Ser10ph levels. The decrease in H3Ser10ph was also observed in human primary hepatocytes expressing the core protein (Fig. 1D).

#### Role of AURKB in decreased phosphorylation of H3Ser10 by HCV and core

AURKB is one of the kinases that phosphorylates Ser10 residue of H3. Therefore, we tested whether HCV infection modified the expression of this kinase. Neither HCV nor core altered mRNA or protein AURKB expression (Fig. 2A and B, respectively). Since AURKB is active when it is phosphorylated [40], we examined whether phosphorylation of AURKB in the Thr-232 residue could be modified by HCV and core. Interestingly, HCV infection and core protein expression decreased the levels of phosphorylated AURKB, concomitant with a decrease in phosphorylation of H3Ser10 (Fig. 2B). Then, the AURKB activity was inhibited by ZM447439 treatment and the levels of Ser10 phosphorylation in H3 were determined. As expected, inhibition of AURKB decreased the levels of H3Ser10ph in uninfected and empty vector transfected cells, relative to the levels of this marker in untreated cells (lanes 1-2 and 3-4 in Fig. 2C and lanes 1 and 3 in Fig. 2D). ZM447439 treatment abolished the core-mediated decrease of phosphorylation of H3Ser10 which were further reduced by HCV infection (lanes 3 and 4 in Fig. 2D and lanes 3-4 and 7-8 in Fig. 2C). Thus, HCV and its core protein decrease AURKB activity and reduce H3Ser10ph levels in the host cells.

#### Interaction between AURKB and HCV core

HCV infection significantly induces the levels of PP2A phosphatase [2], an enzyme which dephosphorylates AURKB resulting

in inhibition of its kinase activity [37]. Thus, HCV core might abolish AURKB activity through PP2A activation. To test this hypothesis, HuH7.5 cells were treated with the PP2A inhibitor, okadaic acid. Inactivation of PP2A phosphatase did not abolish the inhibitory effect of core protein, while in mock infected cells the levels of Ser10 phosphorylation were increased after treatment with okadaic acid, confirming that inhibition of PP2A activates AURKB (Supplementary Fig. 1B).

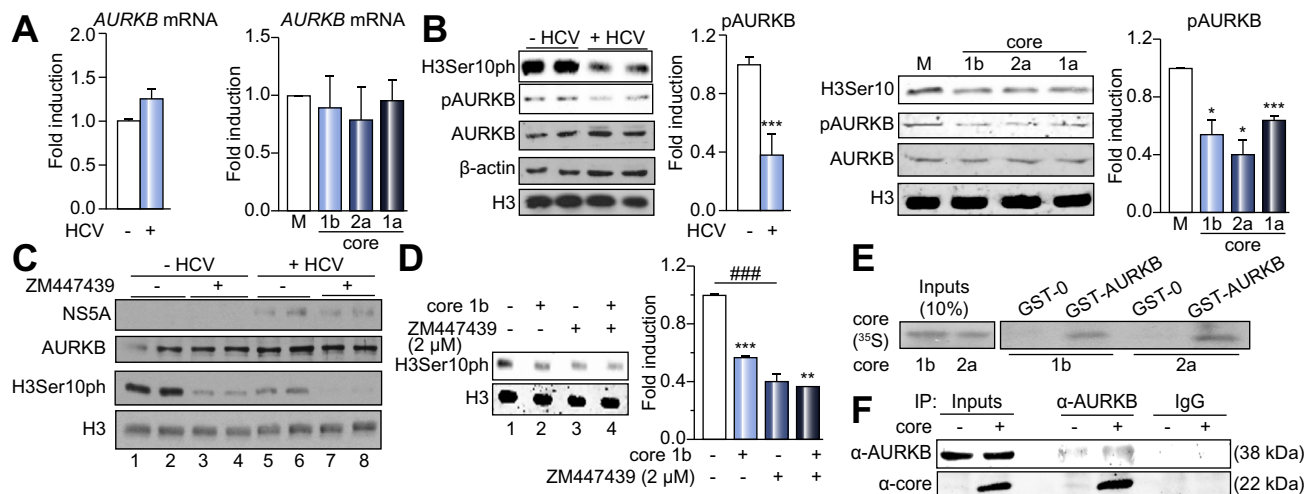
AURKB is also phosphorylated at Ser331 by checkpoint kinase 1 (Chk1), to fully induce AURKB activity in mitosis [31]. In turn, Chk1 is activated by phosphorylation of Ser317 [7]. Thus, we tested whether HCV infection regulates Chk1 activity and consequently the AURKB activity. HCV infection decreased the phosphorylation of Ser317 in Chk1, while core protein expression in HuH7.5 cells produced no effect (Supplementary Fig. 1C and D).

Since core protein expression did not regulate Chk1 or PP2A activities, we analysed whether core interacts with AURKB. *In vitro*, pull-down assays indicated that core interacts with AURKB, an interaction confirmed by co-IP assays using extracts of HuH7.5 cells previously transfected with HCV core (Fig. 2E and F). Supplementary Fig. 2 shows that the catalytic domain of AURKB and the first 122 aa of core are essential to establish this interaction.

#### Alteration of cellular proliferation and viability after HCV infection and core expression

Since AURKB is essential for chromosome stability and cell division [12], we investigated the effect of AURKB inhibition induced by HCV in cell division. Uninfected and HCV infected mitotic cells were labelled with H3Ser10ph antibody. The number of dividing cells decreased upon infection by HCV (Fig. 3A). Both infected and uninfected cells steadily increased the proliferation rate in a similar manner up to 72 h post-infection; however, at 144 h post-infection, HCV infected cultures showed approximately 37% decrease in cell number, as compared to uninfected cells (Fig. 3B). Although cell viability was decreased, cells continued





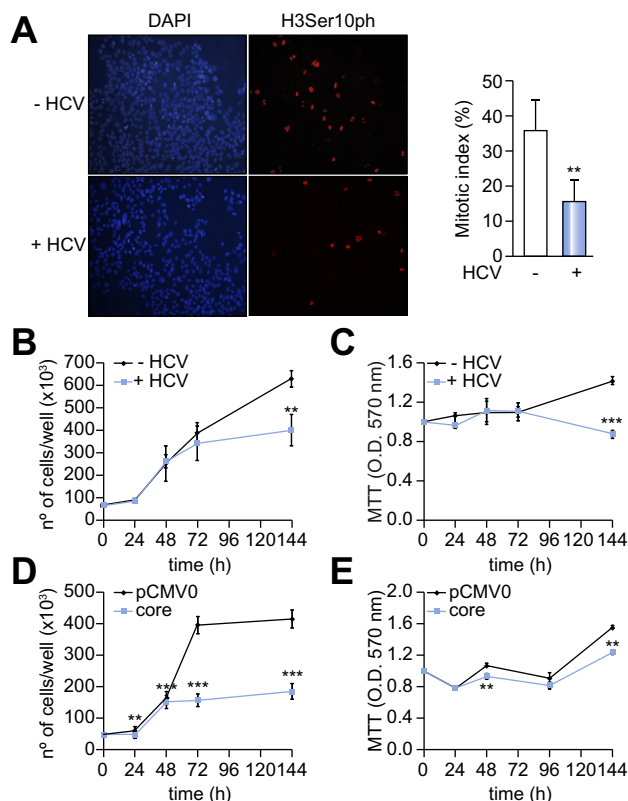
**Fig. 2.** HCV infection decreases AURKB auto-phosphorylation by direct interaction between core and AURKB. (A) AURKB mRNA levels by qRT-PCR in HCV infected or core transfected cells for 72 h. (B) Western blot assay of phosphorylated AURKB (pAURKB), total AURKB and H3Ser10ph protein levels in HCV infected and core expressing cells. (C) NS5A, AURKB, H3Ser10ph and H3 levels in HCV infected cells treated with ZM447439. (D) H3Ser10ph levels after 72 h of core expression and ZM447439 treatment in HuH7.5 cells. (E) GST-AURKB or GST-0 fusion proteins interaction with  $^{35}$ S-labelled core 1b and 2a. (F) 2 mg of protein from core transfected HuH7.5 cells were immunoprecipitated with AURKB or IgG antibodies. Co-immunoprecipitated proteins were analysed by Western blot.

being metabolically active at least until 144 h post-infection, as judged by a high metabolic activity at 144 h (Fig. 3C). A similar effect on cell proliferation a small decrease in viability were obtained upon expression of HCV core (Fig. 3D and E). The overexpression of AURKB slightly increased basal HuH7.5 cell proliferation partially recovered the reduction in cell number induced by HCV infection (Supplementary Fig. 3B). On the other hand, ZM447939 treatment, reduced basal HuH7.5 cell proliferation and further decreased the cell number observed in HCV infected cells (Supplementary Fig. 3A), indicating that HCV decreases proliferation by additional mechanism. These results indicate that the inhibition of AURKB could be one of the mechanisms by which HCV decreases cell proliferation and viability.

#### Effect of HCV and core expression on NF- $\kappa$ B and COX-2 transcriptional regulation

As HCV replication and core expression produced a decrease in cell proliferation and viability, it was interesting to analyse whether the NF- $\kappa$ B pathway was affected. Five hours post-infection, HuH7.5 cells were transfected with a luciferase reporter plasmid that contains three copies of NF- $\kappa$ B binding sites (3xNF- $\kappa$ B-luc) (Fig. 4A). HuH7.5 cells and primary hepatocytes were also transfected with core expression vectors, together with 3xNF- $\kappa$ B-luc (Fig. 4B). Noteworthy, luciferase reporter activity was lower in both HCV infected and core expressing cells (Fig. 4A and B). Since NF- $\kappa$ B is a major anti-apoptotic agent in the liver, levels of the active truncated and the inactive precursor forms of poly (ADP-ribose) polymerase (PARP), a specific caspase substrate, were measured. HCV infection induced PARP cleavage, indicating an increase in apoptosis with a decrease in NF- $\kappa$ B dependent transcription (Supplementary Fig. 4A).

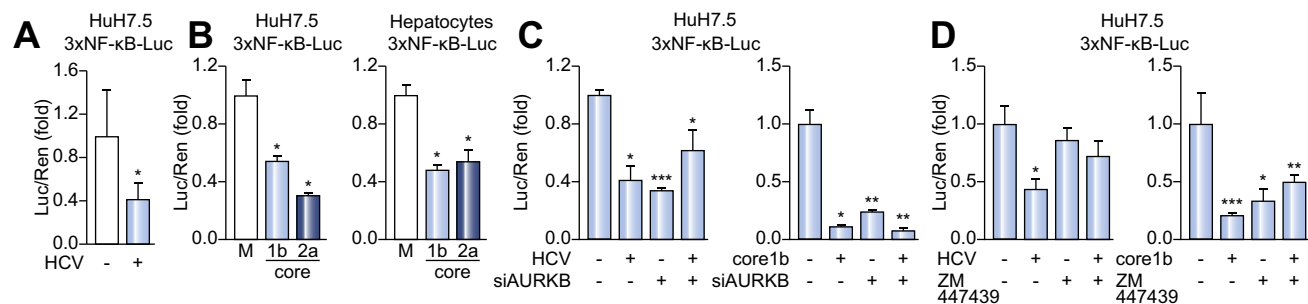
AURKB presents a role in regulation of transcription by increasing H3Ser10 phosphorylation. Since core decreases AURKB activity, it was interesting to investigate whether the inhibition of AURKB expression abolished core-mediated repression of NF- $\kappa$ B transcription. Therefore, HuH7.5 cells were



**Fig. 3.** HCV infection decrease cell proliferation and viability. (A) After 72 h of HCV infection, the total number of cells were labelled with Dapi and the dividing cells visualised by immunofluorescence staining with H3Ser10ph. 1000 interphase and mitotic cells were counted from three independent experiments and the mitotic index expressed in percentage was represented. (B and D) The number of cells per well were counted at indicated times in control cells and HCV infected or core transfected HuH7.5 cells. (C and E) Optical density at 570 nm obtained by MTT cleavage in metabolically active HCV infected and core transfected HuH7.5 cells. Statistical analyses were performed from three independent experiments.



## Research Article

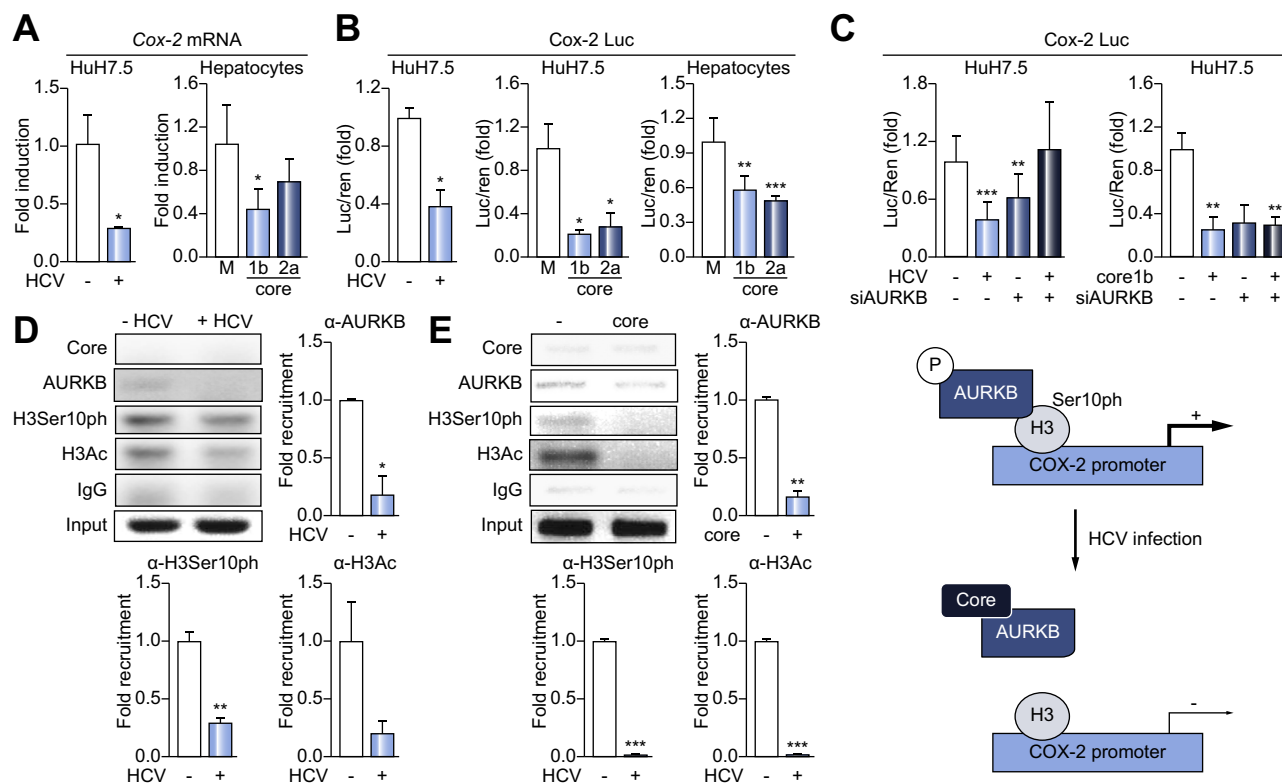


**Fig. 4. HCV and core inhibit NF-κB-stimulated transcription and AURKB expression activity inhibition abolishes this effect.** (A) NF-κB response element (3xNF-κB-Luc) was evaluated in HCV infected HuH7.5 cells. (B) The transcriptional activity of 3xNF-κB-Luc was measured in the presence of core protein in HuH7.5 cells (left panel) and in primary hepatocytes cultures (right panel). (C) Luciferase activity of the 3xNF-κB-Luc plasmid was evaluated after AURKB depletion in HCV infected (left panel) and core expressing HuH7.5 cells (right panel). (D) 3xNF-κB transcriptional activity was evaluated in HCV infected (left panel) or in core expressing HuH7.5 cells (right panel) in the absence or presence of 2 μM ZM447439. Statistical analyses were performed from at least three independent experiments.

infected with HCV or transfected with core together with siRNA of AURKB (Fig. 4C). A 60% inhibition of AURKB mRNA and protein levels (Supplementary Fig. 4B) were sufficient to decrease significantly the NF-κB basal transcription, resulting in a reduction of the inhibitory effect of HCV or core on NF-κB transcriptional regulation (Fig. 4C). Likewise, treatment of HuH7.5 cells with ZM447439 reduced HCV and core inhibitory regulation of NF-κB transcription (Fig. 4D).

NF-κB, as well as the COX-2 gene, are involved in inflammation, anti-apoptosis and carcinogenesis [1]. The expression of

endogenous COX-2 mRNA was decreased by HCV infection in HuH7.5 cells, and also after core expression in human primary hepatocytes (Fig. 5A). To confirm the effect of HCV in COX-2 transcription, HuH7.5 cells were transfected with the COX-2 promoter luciferase reporter plasmid (pCOX-2-luc). HCV infected cells showed decreased COX-2 transcription, compared to uninfected cells (Fig. 5B). COX-2 promoter activity was also decreased by the expression of core in both HuH7.5 cells and human primary hepatocytes (Fig. 5B). The depletion of AURKB expression (Fig. 5C) decreased basal COX-2 transcription and abolished



**Fig. 5. HCV and core inhibits COX-2 transcription.** (A) COX-2 mRNA levels measured by qRT-PCR in HCV infected cells and in human primary hepatocyte cultures expressing core. (B) COX-2-Luc reporter activity was measured in HCV infected HuH7.5 cells and in human primary hepatocyte cells 72 h after transfection with pCMV-Core. (C) COX-2-Luciferase activity was measured in HCV infected and core expressing cells after AURKB depletion. (D, E) ChIP assays with the antibodies indicated in HCV infected or core transfected HuH7.5 cells. The immunoprecipitated -230 bp DNA sequence in the COX-2 promoter was quantified by qPCR and visualised in agarose gels. Bars represent the mean ± S.D. (n > 3).

HCV- and core-induced repression, in agreement with the results obtained in NF- $\kappa$ B-dependent transcription promoter assay (Fig. 4C).

This result, together with the decrease of H3Ser10ph protein levels, suggests that HCV may regulate COX-2 expression through epigenetic modifications. To test this possibility, we performed ChIP assays to examine whether HCV infection modified the H3Ser10ph bound to the COX-2 promoter region. We also tested histone H3 acetylation, an epigenetic marker associated with transcriptional activation. ChIP analyses revealed that the levels of H3Ser10ph and acetylated histone H3 bound to COX-2 promoter were reduced in infected HuH7.5 cells, coincidental with the inhibition of COX-2 transcription. As expected, core was not recruited to the promoter (Fig. 5D). Since H3Ser10ph is induced by AURKB, we also checked AURKB recruitment to the COX-2 promoter. AURKB was associated with the promoter in uninfected cells and this association was reduced in HCV infected cells. Similar experiments were performed in HuH7.5 cells transfected with core (Fig. 5E). The levels of acetylated and Ser10 phosphorylated H3, and AURKB were reduced in the promoter region as a result of core expression. These data suggest that HCV and core regulate transcription of important genes implicated in inflammatory response and that the regulation is mediated by AURKB.

#### Effect of AURKB activity on infectious progeny production

Due to the fact that transcription of genes involved in the inflammatory response was inhibited in the early stage of HCV infection, and was significantly reduced by AURKB inhibition, we examined whether the absence of AURKB expression modifies the production of infectious HCV. The specific infectivity of HCV increased by 66% at 72 h after silencing of AURKB ( $p = 0.023$ ) (Fig. 6A). However, the overexpression of AURKB significantly

decreased HCV specific infectivity by 57% ( $p = 0.03$ ) (Fig. 6B). These results suggest that the core-AURKB interaction may inhibit particle formation.

In the same experiment we observed that AURKB transitory transfection was able to reverse the transcriptional inhibitory effect induced by HCV infection in COX-2 and stimulated NF- $\kappa$ B-dependent gene transcription (Fig. 6C and D). These results indicate an important role of AURKB in the expression of both genes regulated by HCV infection.

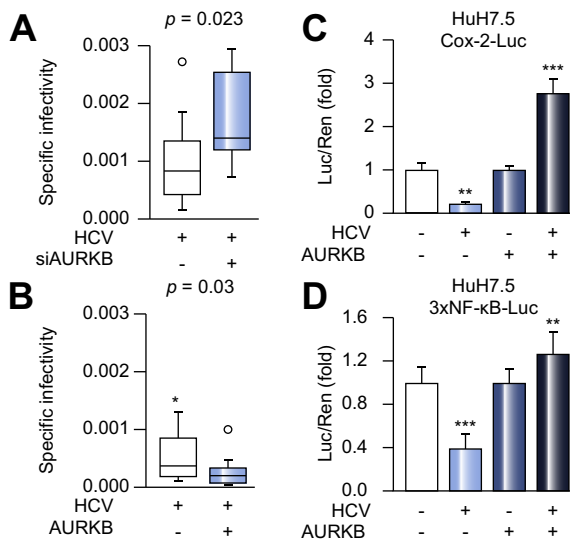
#### Discussion

Liver fibrosis and HCC development have been related to accumulation of genetic and epigenetic defects, which can modify numerous signaling pathways that control cellular proliferation, survival, differentiation and angiogenesis [28]. Some specialized viral functions modulate epigenetic processes that promote viral genome propagation and host-cell survival [6]. The study of how epigenetic events are initiated and established after HCV infection is of special interest to establish whether these processes might contribute to HCV-related disease.

Using the HCV-HuH7.5 cell culture system [3] and human hepatocytes we have documented that HCV infection and core expression reduce phosphorylation of Ser10 in histone H3. This observation is in agreement with previous results that suggest a block in mitotic entry after HCV infection [18] demonstrated by a decrease in H3Ser10ph. Transient transfection of core from different genotypes reduced H3Ser10ph at similar levels. Interestingly, the low expression levels of core 2a, in both HCV infected and core 2a transfected cells, produced a significant reduction in H3Ser10ph (Supplementary Fig. 1A). These results indicate that low infection states could drive to the repression of this epigenetic marker. Although AURKB inhibitor, ZM447439, abolished core-mediated inhibition of H3Ser10 phosphorylation, other HCV proteins might also display the capacity to repress H3Ser10 phosphorylation, although the overexpression of NS5A did not decrease the levels of total H3Ser10ph (Fig. 1C).

AURKB activity at the centromere is increased by Chk1 [41]. In contrast, protein phosphatases PP1 or PP2A interact with AURKB inhibiting its activity [37]. It has been reported that HCV infection significantly induces upregulation of PP2A [2], and that NS5B expression reduces the phosphorylation levels of Chk1 [39]. In spite of Chk1 and PP2A regulating AURKB activity, our results indicate that these activities are not responsible for inhibiting H3Ser10 phosphorylation mediated by core. Using protein-protein interaction assays, we have shown that core binds the catalytic domain of AURKB. This interaction provides an interpretation that AURKB activity is precluded as a consequence of HCV infection and core expression, supported by the decrease in the Thr-232 phosphorylation site of AURKB which is indispensable for the AURKB activity [40] accompanied by a decrease in H3Ser10ph levels.

Some viral infections induce inflammation, which could trigger fibrosis progression, cirrhosis and lastly development of HCC [25]. However, our results show that NF- $\kappa$ B transcription is inhibited by HCV infection and core expression in human primary hepatocytes and in HuH7.5 cells, despite NF- $\kappa$ B playing a role in the pro-inflammatory response [1]. Similarly, we have observed an inhibition of COX-2 gene transcription, despite COX-2 also playing an important role in inflammatory signaling.



**Fig. 6. AURKB expression regulates HCV extracellular infectivity.** (A) AURKB was depleted by transient transfection with siAURKB (150 nM) and the HCV specific infectivity was evaluated by titration from two experiments, with a total number of 13 samples per group. (B) Virus specific infectivity was evaluated by titration after AURKB overexpression from four experiments with a total number of 17 samples per group. (C, D) COX-2-Luc or 3xNF- $\kappa$ B-Luc vectors were transfected in HCV infected HuH7.5 cells together with AURKB (pcDNA3-FLAG-AURKB) expression vector. Luciferase activity was measured. Statistical analyses were performed from three independent experiments.

## Research Article

In agreement with our results, DNA microarray analyses showed that expression of core represses pro-inflammatory signals in HepG2 cells [27]. In macrophages, HEK293 and HeLa cells, core also suppressed NF- $\kappa$ B activation and COX-2 expression by direct interaction with IKK- $\beta$  [17].

Aberrant expression of AURKB is associated with tumor invasion and intrahepatic metastasis of HCC, leading to chromosomal instability and imbalance of multiple tumor suppressor and oncogene regulated pathways [22]. One of the most relevant results in our study is that AURKB is also a target of HCV during the infection process. It is known that the absence or dysregulation of AURKB can give rise to chromosome instability and aneuploidy [12]. However, the effect of HCV infection in chromosomal alterations warrants additional studies. It may also be significant that the oncogenic potential of Epstein-Barr virus has been related with AURKB activity, although the underlined molecular mechanisms are different from those identified until now in our study [15].

ChIP experiments revealed that HCV core triggers epigenetic silencing of COX-2 gene promoter, thereby reducing levels of AURKB and H3Ser10ph which could be due to the core-AURKB interaction (Fig. 5D and E). In this context, the inhibition of AURKB activity could be viewed as a viral mechanism to inhibit pro-inflammatory gene transcription, because the overexpression of AURKB reverses the inhibitory effect of HCV and core on both NF- $\kappa$ B and COX-2 transcription. These results agree with previous reports that demonstrated that AURKB is not only a mitotic kinase but can also play a role as a transcription regulator [14,35,38]. AURKB abrogation also decreases the basal transcription of both NF- $\kappa$ B and COX-2 luciferase reporters (Figs. 4C and 5C). These results suggest a positive regulatory effect of AURKB on NF- $\kappa$ B and COX-2 transcription, a point that requires further investigation.

Several reports have emphasized the relationship between viral infection and replication rate with the inflammatory response where activation of NF- $\kappa$ B is essential to counteract several bacterial and viral infections including HCV infection [21,24,34]. If AURKB overexpression has the capacity to reactivate the pro-inflammatory pathway and to decrease the specific infectivity of HCV, the inhibition of AURKB activity mediated by core can be a mechanism to increase HCV infectivity as we have demonstrated by AURKB silencing assays. Supporting our results, two recent reports have emphasized the importance of other epigenetic activities as key modulators of the viral infectivity [5,10].

Taken together, our results show a new mechanism by which HCV induces epigenetic changes by direct interaction between core and AURKB. The inhibition of AURKB activity increases HCV infectivity through modulation of pro-inflammatory genes. In summary, AURKB activity regulation could be a novel HCV strategy to ensure the persistence of viral infection.

### Financial support

This work was supported by grants BFU2009-11071 and BFU2011-23604 from Ministerio de Ciencia e Innovación, FIS: PI12/02146 and CIBERehd (Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas) from Instituto de Salud Carlos III, Epistem Ltd and Fundación Ramón Areces. Dr Julie Sheldon was supported by a Juan de la Cierva contract from CSIC and Irene Francisco by a fellowship from Spanish Cancer Association (AECC) and Postgraduate studies from the Universidad Autónoma de Madrid.

### Conflict of interest

The authors who have taken part in this study declared that they do not have anything to disclose regarding funding or conflict of interest with respect to this manuscript.

### Authors' contributions

Data acquisition, experimental design and analysis, interpretation of data and critical revision of the manuscript: A. Madejón and J. Sheldon. Data acquisition: I. Francisco-Recuero, M. Dominguez-Beato and J. Muntané. Analysis, interpretation of data and critical revision of the manuscript: E. Domingo, J. Garcia-Samaniego and C. Perales. Critical revision of the manuscript: M. Lasa, I. Sanchez-Perez.

### Acknowledgements

We thank Professor Charles Rice for providing the HCV plasmids: Jc1, Con1, H77, HuH7.5 cells, and NS5A monoclonal antibody 9E10. Dr. Miguel Angel Iñiguez for COX-2 reporter plasmids, Dr. Paloma Martín for COX-2 RTPCR primers and Dr. Marcos Malumbres for Aurora-BpT232 antibody and GST-AURKB plasmid. Dr. Ignacio Palmero and Dr. Carmela Cales for valuable discussions. Ana Isabel De Avila, and Isabel Gallego for technical assistance. Brenda Ashley Morris for English revision.

### Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhep.2015.02.036>.

### References

- [1] Ben-Neriah Y, Karin M. Inflammation meets cancer, with NF- $\kappa$ B as the matchmaker. *Nat Immunol* 2011;12:715–723.
- [2] Bernsmeier C, Duong FH, Christen V, Pugnale P, Negro F, Terracciano L, et al. Virus-induced over-expression of protein phosphatase 2A inhibits insulin signalling in chronic hepatitis C. *J Hepatol* 2008;49:429–440.
- [3] Blight KJ, McKeating JA, Rice CM. Highly permissive cell lines for subgenomic and genomic hepatitis C virus RNA replication. *J Virol* 2002;76:13001–13014.
- [4] Chappell G, Kutanzi K, Uehara T, Tryndyak V, Hong HH, Hoenerhoff M, et al. Genetic and epigenetic changes in fibrosis-associated hepatocarcinogenesis in mice. *Int J Cancer* 2014;134:2778–2788.
- [5] Chen C, Pan D, Deng AM, Huang F, Sun BL, Yang RG. DNA methyltransferases 1 and 3B are required for hepatitis C virus infection in cell culture. *Virology* 2013;441:57–65.
- [6] Chen HS, Lu F, Lieberman PM. Epigenetic regulation of EBV and KSHV latency. *Curr Opin Virol* 2013;3:251–259.
- [7] Donzelli M, Draetta GF. Regulating mammalian checkpoints through Cdc25 inactivation. *EMBO Rep* 2003;4:671–677.
- [8] Duong FH, Christen V, Berke JM, Penna SH, Moradpour D, Heim MH. Upregulation of protein phosphatase 2A by hepatitis C virus modulates NS3 helicase activity through inhibition of protein arginine methyltransferase 1. *J Virol* 2005;79:15342–15350.
- [9] Duong FH, Christen V, Lin S, Heim MH. Hepatitis C virus-induced up-regulation of protein phosphatase 2A inhibits histone modification and DNA damage repair. *Hepatology* 2010;51:741–751.
- [10] Fang TC, Schaefer U, Mecklenbrauker I, Stienen A, Dewell S, Chen MS, et al. Histone H3 lysine 9 di-methylation as an epigenetic signature of the interferon response. *J Exp Med* 2012;209:661–669.

- [11] Fu J, Bian M, Jiang Q, Zhang C. Roles of Aurora kinases in mitosis and tumorigenesis. *Mol Cancer Res* 2007;5:1–10.
- [12] Giet R, Petretti C, Prigent C. Aurora kinases, aneuploidy and cancer, a coincidence or a real link? *Trends Cell Biol* 2005;15:241–250.
- [13] Goto H, Yasui Y, Nigg EA, Inagaki M. Aurora-B phosphorylates Histone H3 at serine28 with regard to the mitotic chromosome condensation. *Genes Cells* 2002;7:11–17.
- [14] Hengeveld RC, Hertz NT, Vromans MJ, Zhang C, Burlingame AL, Shokat KM, et al. Development of a chemical genetic approach for human aurora B kinase identifies novel substrates of the chromosomal passenger complex. *Mol Cell Proteomics* 2012;11:47–59.
- [15] Jha HC, Lu J, Saha A, Cai Q, Banerjee S, Prasad MA, et al. EBNA3C-mediated regulation of aurora kinase B contributes to Epstein-Barr virus-induced B-cell proliferation through modulation of the activities of the retinoblastoma protein and apoptotic caspases. *J Virol* 2013;87:12121–12138.
- [16] Jones CT, Catanese MT, Law LM, Khetani SR, Syder AJ, Ploss A, et al. Real-time imaging of hepatitis C virus infection using a fluorescent cell-based reporter system. *Nat Biotechnol* 2010;28:167–171.
- [17] Joo M, Hahn YS, Kwon M, Sadikot RT, Blackwell TS, Christman JW. Hepatitis C virus core protein suppresses NF-kappaB activation and cyclooxygenase-2 expression by direct interaction with IkappaB kinase beta. *J Virol* 2005;79:7648–7657.
- [18] Kannan RP, Hensley LL, Evers LE, Lemon SM, McGivern DR. Hepatitis C virus infection causes cell cycle arrest at the level of initiation of mitosis. *J Virol* 2011;85:7989–8001.
- [19] Katayama H, Sen S. Aurora kinase inhibitors as anticancer molecules. *Biochim Biophys Acta* 2010;1799:829–839.
- [20] Lambert MP, Paliwal A, Vaissiere T, Chemin I, Zoulim F, Tommasino M, et al. Aberrant DNA methylation distinguishes hepatocellular carcinoma associated with HBV and HCV infection and alcohol intake. *J Hepatol* 2011;54:705–715.
- [21] Li Q, Pene V, Krishnamurthy S, Cha H, Liang TJ. Hepatitis C virus infection activates an innate pathway involving IKK-alpha in lipogenesis and viral assembly. *Nat Med* 2013;19:722–729.
- [22] Lin ZZ, Jeng YM, Hu FC, Pan HW, Tsao HW, Lai PL, et al. Significance of Aurora B overexpression in hepatocellular carcinoma. *Aurora B Overexpression in HCC. BMC Cancer* 2010;10:461.
- [23] Mann J, Chu DC, Maxwell A, Oakley F, Zhu NL, Tsukamoto H, et al. MeCP2 controls an epigenetic pathway that promotes myofibroblast transdifferentiation and fibrosis. *Gastroenterology* 2010;138:705–714, 714, e701–e704.
- [24] Mohamed MR, McFadden G. NFkB inhibitors: strategies from poxviruses. *Cell Cycle* 2009;8:3125–3132.
- [25] Moore PS, Chang Y. Why do viruses cause cancer? Highlights of the first century of human tumour virology. *Nat Rev Cancer* 2010;10:878–889.
- [26] Moriya K, Fujie H, Shintani Y, Yotsuyanagi H, Tsutsumi T, Ishibashi K, et al. The core protein of hepatitis C virus induces hepatocellular carcinoma in transgenic mice. *Nat Med* 1998;4:1065–1067.
- [27] Nguyen H, Sankaran S, Dandekar S. Hepatitis C virus core protein induces expression of genes regulating immune evasion and anti-apoptosis in hepatocytes. *Virology* 2006;354:58–68.
- [28] Nishida N, Goel A. Genetic and epigenetic signatures in human hepatocellular carcinoma: a systematic review. *Curr Genomics* 2011;12:130–137.
- [29] Patel DJ, Wang Z. Readout of epigenetic modifications. *Annu Rev Biochem* 2013;82:81–118.
- [30] Perales C, Beach NM, Gallego I, Soria ME, Quer J, Esteban JI, et al. Response of hepatitis C virus to long-term passage in the presence of alpha interferon: multiple mutations and a common phenotype. *J Virol* 2013;87:7593–7607.
- [31] Petsalaki E, Akoumianaki T, Black EJ, Gillespie DA, Zachos G. Phosphorylation at serine 331 is required for Aurora B activation. *J Cell Biol* 2011;195:449–466.
- [32] Pichard L, Raulet E, Fabre G, Ferrini JB, Ourlin JC, Maurel P. Human hepatocyte culture. *Methods Mol Biol* 2006;320:283–293.
- [33] Pietschmann T, Kaul A, Koutsoudakis G, Shavinskaya A, Kallis S, Steinmann E, et al. Construction and characterization of infectious intragenotypic and intergenotypic hepatitis C virus chimeras. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:7408–7413.
- [34] Rance E, Tanner JE, Alfieri C. Inhibition of IkappaB kinase by thalidomide increases hepatitis C virus RNA replication. *J Viral Hepat* 2012;19:e73–80.
- [35] Sabbatini P, Canzonetta C, Sjoberg M, Nikic S, Georgiou A, Kembell-Cook G, et al. A novel role for the Aurora B kinase in epigenetic marking of silent chromatin in differentiated postmitotic cells. *EMBO J* 2007;26:4657–4669.
- [36] Sawan C, Vaissiere T, Murr R, Herceg Z. Epigenetic drivers and genetic passengers on the road to cancer. *Mutat Res* 2008;642:1–13.
- [37] Sugiyama K, Sugiura K, Hara T, Sugimoto K, Shima H, Honda K, et al. Aurora-B associated protein phosphatases as negative regulators of kinase activation. *Oncogene* 2002;21:3103–3111.
- [38] Tardaguila M, Gonzalez-Gugel E, Sanchez-Pacheco A. Aurora kinase B activity is modulated by thyroid hormone during transcriptional activation of pituitary genes. *Mol Endocrinol* 2011;25:385–393.
- [39] Wang Y, Xu Y, Tong W, Pan T, Li J, Sun S, et al. Hepatitis C virus NS5B protein delays s phase progression in human hepatocyte-derived cells by relocalizing cyclin-dependent kinase 2-interacting protein (CINP). *J Biol Chem* 2011;286:26603–26615.
- [40] Yasui Y, Urano T, Kawajiri A, Nagata K, Tatsuka M, Saya H, et al. Autophosphorylation of a newly identified site of Aurora-B is indispensable for cytokinesis. *J Biol Chem* 2004;279:12997–13003.
- [41] Zachos G, Black EJ, Walker M, Scott MT, Vagnarelli P, Earnshaw WC, et al. Chk1 is required for spindle checkpoint function. *Dev Cell* 2007;12:247–260.

In: Gonorrhea and Viral Hepatitis  
Editor: Leonard H. Sullivan

ISBN: 978-1-63463-008-5  
© 2015 Nova Science Publishers, Inc.

### Chapter 3

---

## Hepatitis C Virus and Epigenetic Modifications

---

*Aurora Sánchez-Pacheco<sup>3</sup>, Antonio Madejón<sup>1,2</sup>,  
Irene Francisco-Recuero<sup>1,3</sup>,  
and Javier García-Samaniego<sup>1,2\*</sup>*

<sup>1</sup>Gastroenterology Service. Hospital La Paz-Carlos III, Madrid, Spain

<sup>2</sup>Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades  
Hepáticas y Digestivas (CIBERehd), Instituto Salud Carlos III,  
Madrid, Spain

<sup>3</sup>Departamento de Bioquímica, UAM, Instituto de Investigaciones  
Biomédicas Alberto Sols, CSIC-UAM, Madrid, Spain

### Abstract

The epigenetic regulation of gene expression levels, through the control of the DNA methylation, interaction with microRNAs and the posttranslational changes in histones, are essential for controlling basic cellular processes such as transcription, replication and repair DNA. Deregulation of these mechanisms play an important role in a wide range of diseases including liver cancer and hepatic fibrosis. The relationship

---

\* Corresponding author: Dr. Javier García-Samaniego, CIBERehd, Gastroenterology Service. Hospital La Paz-Carlos III, C/ Sinesio Delgado, 10, 28029 Madrid, Spain. Email address: JAVIERSAMANIEGO@telefonica.net, Phone number: (+34)914532510.

between hepatitis C virus (HCV) infection and epigenetic changes induction, as well as, its implication in the progression of the hepatic disease, is at the moment an interesting field but currently not well understood. The best known correlation between HCV and the epigenetic regulation, is the role of different cellular microRNAs (miRNAs) in the regulation of HCV replication. Thus, the interaction between microRNAs and the 3'-UTR viral region inhibits protein translation. In contrast, HCV replication is positively regulated by the interaction of miR-122 with the viral 5-UTR. Based in this effect, a novel genetic therapy strategy against HCV infection has been developed by targeting miR-122 with a blocking oligonucleotide. In addition HCV infection also induces de-regulation of miRNAs implicated in the interferon response pathways, and in the onset of chronic inflammation and fibrosis. HCV has also the ability to modify DNA methylation patterns. It has been reported that HCV infection is associated with the accumulation of aberrant DNA methylation of multiple genes in cell cultures and animal models. Moreover, similar aberrant pattern has been described in hepatocellular carcinoma (HCC) of patients with chronic hepatitis C. Some of these changes have been proposed as predictive markers of HCC development. Finally, the worst known aspect of the HCV-based epigenetic regulation is the induction of covalent post-transcriptional modification in cellular histones. It has been described that HCV infection leads to over-expression of protein phosphatase 2A, which potentially affects acetylation and methylation of histone 4 and phosphorylation of histone 2AX. A reduction of Ser10 histone H3 phosphorylation (H3Ser10ph) has been reported in HCVcc system to demonstrate that HCV infection causes cell cycle arrest at the initiation of mitosis. The study of the role of HCV in the regulation of chromatin structure through epigenetic modification could be of special interest to understand the progression of the liver disease in patients with chronic hepatitis C. Nowadays this is especially significant, because the novel therapies using direct antiviral agents (DAAs) allow the eradication of viral infection in most patients. However, some experimental results suggest that the cells remain sensitized after the disappearance of the causative stimulus of an epigenetic modification. Thus, the reappearance of the same or closed related stimulus could induce a rapid reactivation of the epigenetic alterations.

## Introduction

Cellular processes depend on the proper genetic and epigenetic regulation. The term "epigenetic" comprises a set of mechanisms that do not change the primary sequence of the DNA double strand but are able to modify gene



function. During cell division these epigenetic modifications are passed to daughter cells to maintain cellular memory. Epigenetic mechanisms play an important role during development and are essential to control normal cellular functions. The discovery of altered epigenetic profiles in human tumors has been a major factor in constructing a new model of gene regulation, in which epigenetic variability is a critical factor that contributes significantly to human disease. The best known epigenetic mechanisms are covalent modification of DNA by methylation, covalent modifications of amino acids in histones and small non-coding microRNAs. Some of these epigenetic mechanisms are reversible and thus new chemicals against these targets are being investigated like therapeutic tools in relevant pathologies. Environmental agents such nutrients, chemicals and pathogens like bacterial or virus infections can affect epigenetic regulation and alter basic cellular processes.

Hepatitis C virus (HCV) is one of the most important pathogens whose etiology and molecular mechanism of action have been extensively studied during the past two decades. HCV infection affects to a significant proportion of the world population and the persistence of HCV replication may let to fibrosis and in some cases to the development of liver cirrhosis hepatocellular carcinoma (HCC). In the last years several studies have identified a large number of genes and pathways that are targeted by epigenetic regulation during the development and progression of cirrhosis and HCC. Additional studies have shown that HCV infection and mainly core and NS5A coding proteins can modify cellular processes throughout genetic and epigenetic regulation. These data underline the importance of association studies between epigenetic signatures in pre-cancerous lesions and HCV tumors with specific risk factors and tumor progression stage.

## DNA Methylation

DNA methylation consists in the addition of one methyl group (CH<sub>3</sub>) from S-adenosyl-L-methionine (SAM) to the 5'-cytosine nucleotide when positioned next to a guanine creating 5'-methylcytosine. In mammals methylation occurs at the 5'-CPG-3' dinucleotide, through at CpNpGs is also observed (Clark et al., 1995). These regions rich in CpG are named CpG islands (CGI) and are defined like DNA sequence large than 200pb with a GC content higher than 50% (Sandoval & Esteller, 2012). DNA methylation is mediated by a family of DNA methyltransferases (DNMT1, DNMT2, DNMT3A, DNMT3B, and DNMT3L).

Among these proteins only DNMT1, DNMT3A and DNMT3B have methyltransferase activity. DNMT1 acts during replication, maintaining the methylation pattern of the parent DNA strand, which copy and transfer to newly synthesized strand (Okano et al., 1998). DNMT3A and DNMT3B create new methylation over unmethylated CpG dinucleotides so they are considered “*nov*o methyltransferases”.

Mechanistically, DNA methylation (hypermethylation) of CpG in gene promoter regions which in normal cells are un-methylated, leads to transcriptional gene silencing, precluding the accessibility of transcription factors to their binding sites on the promoter region of the regulated genes (Esteller, 2007).

This phenomenon of aberrant promoter hypermethylation (Gama-Sosa et al., 1983; Jones & Baylin, 2007) is associated with loss of gene function and occurs mainly in tumor suppressor genes although other genes with important functions during differentiation or apoptosis can also be transcriptional repressed. It is well established that DNA methylation changes, unlike genetic events, occur in a gradual manner.

Apart from CpG sites existing in the promoter regions, repetitive sequences such as ribosome DNA repeats, satellite repeats, or centromeric repeats are targets of methylation. These regions are normally highly methylated limiting accessibility to the transcription factors but contributing to chromosomal stability (Esteller, 2007). During ageing, carcinogenesis processes and chronic disease development, DNA methylation decreases (hypomethylation) which is associated to genomic instability and chromosomal aberrations (Goelz et al., 1985).

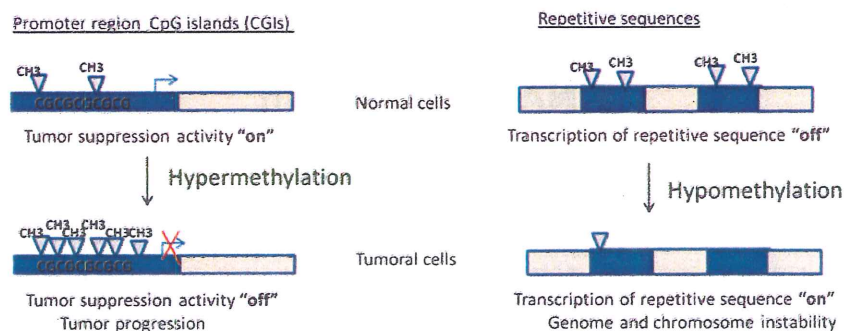


Figure 1. Schematic representation of the hypermethylation in promoter regions and hypomethylation in repetitive sequences.



## DNA Methylation in HCC

Aberrant DNA methylation was the first epigenetic alteration identified in HCC and other human cancers (Guerrero-Preston et al., 2007; Lin et al., 2001). Carcinogenic liver tissue can be distinguished from surrounding normal tissue by DNA methylation pattern (Herceg & Paliwal, 2011). Interestingly, in HCC both DNA hypomethylation and DNA hypermethylation have been described (Hernandez-Vargas et al., 2010; Shen et al., 2012; Shen et al., 2013; Song et al., 2013)

- Hypomethylation

Several reports have established the importance of DNA hypomethylation in premalignant alteration and in HCC development (Guerrero-Preston et al., 2007), such as DNA hypomethylation leads to genomic instability in human carcinomas. Further, the level of DNA hypomethylation increases with tumor progression (Lin et al., 2001). However it is still not clear if hypomethylation induces malignant transformation or appears as a consequence of the tissue degeneration process (Wild & Flanagan, 2010).

Interspersed nucleotide elements 1 (LINE1), Alu and SAT2 repetitive elements are mainly hypomethylated in HCC (Kim et al., 2009; Takai et al., 2000; Tangkijvanich et al., 2007) and significantly, LINE-1 hypomethylation detected in serum of patients may be used like a HCC prognosis marker (Tangkijvanich et al., 2007). The levels of 5-methylcytosine in HCC are significantly reduced while in cirrhotic liver are not altered. This reduction seems to be associated with tumor size and bad prognosis (Lin et al., 2001).

- Hypermethylation

Specific combinations of DNA methylated genes in HCC tumors have been associated with major risk factors and tumor progression state which could be useful tools in the diagnosis and prognosis of HCC (Edamoto et al., 2003; Lambert et al., 2011; Um et al., 2011). DNA methylation changes in promoters of tumor suppressor genes such as RASSF1A, p16, SUK, CRABP1, GSTP1, CHRNA3, DOK1, SFRP1, GAAD45a and p15 are associated with HCC, while hypermethylation of the CHFR and SKY genes are detected specifically in advanced stages of HCC.

DNA hypermethylation events can be related with the up-regulation of DNMT activity seen in human cancer including HCC. Increased levels of DNMT1, 3a and 3b have been detected in HCC and cirrhotic liver compared with non-cancerous liver tissues. Over-expression of DNMT1 and DNMT3a expression was also reported in premalignant alteration such as dysplastic nodules, (Park et al., 2006; Saito et al., 2003; Saito et al., 2002). HCC with increased DNMT1 protein expression significantly correlates with poor tumor differentiation and portal vein involvement. Moreover, the patients with high DNMT1 protein levels showed lower survival rates than those with HCC and normal expression. These data support the concept that increased DNMT1 protein expression may be used as a predictor tool of HCC recurrence and poor prognosis in HCC patients (Saito et al., 2003).

DNMT3b4 is a splice variant of DNMT3b which lacks of DNA methyltransferase activity but it correlates with DNA hypomethylation on satellite regions. Over-expression of DNMT3b4 has been detected in chronic hepatitis, cirrhotic liver and HCC. Thus, it could be related with chromosomal instability in human hepatocarcinogenesis (Saito et al., 2002).

## **DNA Methylation Regulated by HCV Infection**

HCC in patients with previous HCV infection is closely associated to alteration in the DNA methylation pattern of tumor suppressor genes suggesting that the presence of HCV may contribute to the emergence of abnormal methylation. However, it is still not clear if these epigenetic changes can be induced by chronic inflammation (Nishida & Goel, 2011; Nishida et al., 2008; Tischoff & Tannapfe, 2008).

Nishida and Goel characterized methylation patterns identifying in liver biopsies from chronic hepatitis C patients, a subset of eight TSG (HIC1, GSTP1, SOCS1, RASSF1, CDKN2A, APC, RUNX3, and PRDM2) that play a critical role in the earliest steps in hepatocarcinogenesis (Nishida et al., 2012). The same authors propose that patients without HCV or cirrhosis may be more likely to develop HCC via DNA hypomethylation, in contrast to HCV related carcinogenesis where HCV infection may increase DNA hypermethylation leading to TSG inactivation (Nishida et al., 2013).

Additional studies in HCV-positive HCC tumors, have also described several tumor suppressor genes such as SOC-1, GADD45b, STAT1, APC and

p15 showing higher DNA methylation levels than in HCV negative HCC tumors (Duong et al., 2010; Fernandez & Esteller, 2010; Higgs et al., 2010; Li et al., 2005).

A recent screening of 1505 CpG sites in 807 cancer related genes promoter, using bead array and pyrosequencing, has been performed in 30 HCC tumors and their respective surrounding tissue. This study has correlated the methylation data with clinical outcomes. Thus, specific DNA methylation signatures associated with major risk factors (HBV or HCV infection and alcohol consumption) allow predict patient survival and clinical parameters such as stage and grade of the tumor. This could be a novel strategy for early detection and clinical prediction in HCC. For example, three CpG sites were significantly hypomethylated in grade 3 tumors (HOXXB2, DDR2, and TIMPB) while 19 CpG sites were hypermethylated (including CDK2, EF3, FANCF, LIF, RASGRF1, DNMT1 and ERCC1). In HCV-related HCC, 2 CpG sites (RIK and CHGA) were specifically methylated (Hernandez-Vargas et al., 2010).

The influence of HCV infection in DNMTs expression levels have been recently demonstrated by Quan and colleagues. HCV can alter the epithelial mesenchymal transition (EMT) by E-cadherin and SFRP expression reduction (Quan et al., 2014). Both promoter genes are highly methylated in presence of core protein which increases the expression of DNMT1 and DNMT3b.

## Histone Tails Modifications

Chromatin is the condensed combination of DNA and histones where the genes are packed inside the nucleus of a cell. The basic unit of the chromatin is the nucleosome which is constituted by a 147pb sequence of DNA wrapped around a histone octamer composed of two copies of histone H3, H4, H2A and H2B (Figure 2). Electron microscopy studies showed a necklace structure formed by the individual nucleosomes linked by a short sequence of DNA (60pb) Histone H1, a linker histone, interacts with other non-histones proteins packing the nucleosomes into higher-order chromatin structure.

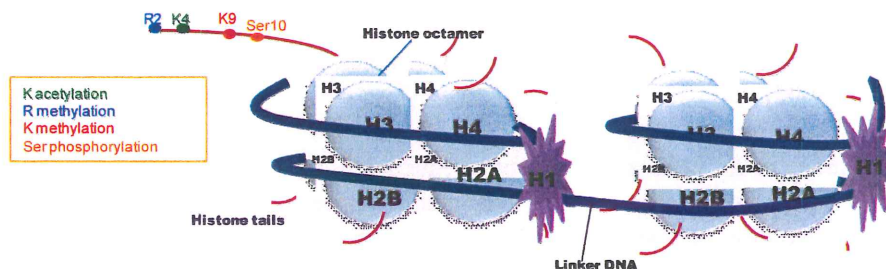


Figure 2. Schematic representation of the nucleosome structure. 146 bps of DNA are wrapped around two copies of histone H3, H4, H2A and H2B. N- and C- terminal histone tails extend from the globular domain and are target of different post-translational covalent modifications. As an example, some target residues in the H3 histone are represented.

Histones are well conserved between species, contain a globular domain and two protruding amino-acidic sequence (histone tails) in both the N-terminal and C- terminal domain. The N-terminal domain contains 20-35 aa while the C-terminal domain is shorter. Both tails can be modified by acetylation, methylation, phosphorylation, ADP-rybosilation, deamination and ubiquitylation which are catalyzed by different families of enzymes (Bannister & Kouzarides, 2011). Additionally, a tail can be modified by multiple types of modifications, even each amino acid residues can be modified in different states, for instance mono-, di- or tri-methylation at lysine residues. The combination of these modifications has been related with several biological processes establishing the concept of the “histone code” (Jenuwein & Allis, 2001). Among this code, the histone modifications favor the recruitment of other proteins that alter chromatin structure and thereby affect relevant cellular processes including transcription, DNA replication, DNA repair and genomic stability. Aberrant patterns of histone modifications are a hallmark of cancer (Sandoval & Esteller, 2012) and include changes in their levels and distribution at gene promoters, gene coding regions, repetitive DNA sequences, and other genomic elements. In general, increased prevalence of cells with lower global levels of histone modifications is prognostic of poorer clinical outcome such as increased risk of tumor recurrence and/or decreased survival probability (Kurdistani, 2011).

As well as DNA methylation, some of these histone modifications are reversible and also exist families of enzymatic activities that carry out these functions, for example acetylation, that consist in the addition of a acetyl group to a lysine residue is catalyzed by histone acetyltransferases (HATs) family which could be remove it by the action of histone deacetylases

(HDACs) family. The dynamic equilibrium of lysine acetylation *in vivo* is governed by the opposing actions of HATs and HDACs (Yang & Seto, 2007). Lysine acetylation neutralized the positive charge of histone tails, decreasing the interaction between DNA and histones and opening the chromatin structure (defined such as “euchromatin”). This open structure favors the binding of transcription factors to their specific recognition sites in the promoter region of a gene favoring the process of transcription. Consequently, proteins with HAT activity are considered transcriptional co-activators. Conversely, deacetylation of histones by HDACs leads to a closed chromatin conformation or “heterochromatin” and diminishes gene transcription. HATs proteins form a family of 25 proteins including the TAFII250, p300/CBP, SRC (SRC-1) and the GNAT (hGCN5, PCAF) among others (Hodawadekar & Marmorstein, 2007). HDACs are 18 proteins grouped in four classes: class I, II and IV, that include HDACs 1-11, which activity is Zinc-dependent while class III comprised of sirtuins 1-7 that uses  $\text{NAD}^+$  as a cofactor.

Together with histone acetylation and deacetylation, histone methylation is one of the best studied histone covalence modification (Ng et al., 2009). Histone methylation consists in the addition of a methyl group to the lysine and arginine residues mainly in histone H3 and histone H4. Arginine methylation can be mono- or di-methylated by protein arginine methyltransferases (PRMTs) family (Bedford & Clarke, 2009; Wolf, 2009). Similar to arginine methylation, lysine methylation can be mono- di- and trimethylated (Lan & Shi, 2009). Histone lysine methylation activates or represses gene expression. Methylation in H3K4, H3K36 and H3K79 is generally associated with euchromatin (active chromatin), whereas methylation at H3K9, H3K27 and H4K20 is frequently associated to heterochromatin (inactive chromatin). Histone lysine methylation is carried out by 50 members of histone methyltransferases (HMTs) grouped in six families: SET1, SET2, Suv39, EZH, SMYD, and RDM among others (Morishita & di Luccio, 2011). Histone methylation is also reversible and these reactions are catalyzed by histones demethylases (HDMs) comprising the histone lysine demethylase 1 (LSD1) and the 20 proteins of the Jumonji (JmjC) domain containing histone demethylase family (Cheng, 2014).

## Histone Modifications in HCC

Most of the known HCC-associated aberrant histone modification events affect expression of critical cellular genes and thus impair normal cellular

activities. Deacetylation of lysine residues at histone H3 and H4 have been associated with the transcriptional repression of several genes in human HCC (Chiba et al., 2004). The treatment with the HDAC inhibitor, trichostatin A (TSA), up-regulates the expression of 57 genes in hepatoma cells and some of them are cancer-related genes in HCC.

Histones methylation is also implicated in the transcriptional silencing of the tumor suppressor genes RIZ12, p16Ink4 and RASSF1A in human HCC. A significantly increase in the levels of histone H3 lysine 9 and histone H3 lysine 27 methylation at their promoter region repress the transcription of these genes (Chiba et al., 2004; Kondo et al., 2007; Yao et al., 2010).

Although histone modifications are observed in the regulatory region of tumor suppressor genes, global histone modifications also occur in HCC. Decrease of the tri-methylation of histone H4 lysine 20 and increase of histone H3 lysine 27 tri-methylation and histone H3 phosphorylation is observed in HCC relative to adjacent non-tumor liver tissues (Cai et al., 2011; Fraga & Esteller, 2005; Sistayanarain et al., 2006). High levels of H3K27me3 predicted worse prognosis, and were additionally closely correlated with aggressive tumor features, including vascular invasion, large tumor size, multiplicity and poor differentiation of tumors and short survival of patients with HCC. Therefore, this histone mark may be a reference marker for a poor prognosis in patients with HCC (Cai et al., 2011).

Low expression of Ash2 complex and of the de-methylation enzyme (LSD1) is frequently observed in HCC. Consequently, di-methylation of histone H3 at lysine 4 (H3K4me2) is expressed at almost undetectable levels in HCC (Magerl et al., 2010). However, were correlated with reduced overall survival and poor prognosis in HCC (He et al., 2012).

Several histone-modifying enzymes are significantly deregulated in HCC, including histone deacetylase (HDAC) and histone methyltransferases (HMTs). High expression levels of class 1 HDAC (HDAC1, HDAC2 and HDAC3) correlates with malignant phenotype and poor prognosis in human HCC. A clinical study in infected with hepatitis B virus (HBV)-associated HCC patients treated by liver transplantation, HDAC 1, 2 and 3 were highly expressed. HDACs depletion experiments by siRNA experiments showed that inhibition of HDAC2 and HDAC3, but not HDAC1 suppressed proliferation and invasiveness of liver cancer cells. Therefore, increased expression levels of HDAC2 and 3 were significantly associated with reduced recurrence-free survival of HCC. HDAC3 has been propose as a candidate biomarker for predicting the recurrence of HBV-associate HCC following liver transplantation (Wu et al., 2010).

Increased expression of the EZH2, SMYD3 and decreased expression of RIZ1 have been also measured in HCC. These histone methyltransferases enzymes are responsible for methylation of lysine residues 27, 4 and 9 at histone H3, respectively. EZH2 is a catalytic subunit of the polycomb repressive complex (PRC2) that mediates epigenetic silencing by tri-methylation of K27. The increased expression of EZH2 is in concordance with the high levels of H3K27me3 observed in HCC tissues, suggesting that EZH2 and K27 tri-methylation are suitable markers for poor prognosis in patients with HCC (Cai et al., 2011; Hung et al., 2014; Sudo et al., 2005). A recent report has demonstrated the oncogenic activity of EZH2 by epigenetic silencing of the growth-suppressive Wnt antagonists and activation of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling in hepatocellular carcinomas (HCC). Down-regulation of EZH2 reduced HCC cell growth indicating that EZH2 contributes to constitutive proliferation of HCC cells, thus representing a novel therapeutic target for this type of tumor (Cheng et al., 2011).

The up-regulation of the SMYD3 HMT also stimulates proliferation of HCC cells (Hamamoto et al., 2004). The increase of H3K4 methylation, mark related to transcriptional activation, may be related with the activation of NKX2-8 gene which is frequently up-regulated in human HCC (Pogribny & Rusyn, 2014). Conversely, the down regulation of RIZ1 could mediate the reduction of H3K9me3 which contribute to chromatin decondensation and genomic instability, a characteristic feature frequently found in HCC (Pogribny & Rusyn, 2014).

## Histone Modifications Induced by HCV

Certain histone code alterations are a signature for specific risk factor exposures. HCV infection induces an over-expression of Protein Phosphatase 2A (PP2A) which binds to protein arginine methyltransferase 1 (PRMT1) and inhibits its activity (Duong et al., 2010). PRMT1 catalyzed the methylation of histone H4 on arginine 3 and also plays an important role in DNA repair by dephosphorylation the damage-induced phosphorylation of H2AX. Hence PP2A over-expression in HCV-associated HCCs leads to compromised histone H4 methylation/acetylation and histone H2AX phosphorylation, significantly changing the expression of genes important for hepatocarcinogenesis and inhibiting DNA damage repair.

RT PCR and tissue microarray based immunohistochemistry (TMA bases IHC) data showed that four of twenty-four genes over eight-fold up regulated

in tumor tissues. These genes were the histone phosphorylation AURKB, and the lysine and arginine methylation like G9a, Suv39H2, EZH2). However, only Suv39H2 high expression was associated with HCV infection and tumor stage in HCC cases (Hung et al., 2014).

Further studies are required to understand the effect of HCV in histone covalent modification. How these alterations may be related with different fibrosis states and development and progression of HCC is still a matter of interest.

## miRNAs

Micro RNAs (miRNAs) are small non-coding RNAs of 20-23 nucleotides in length that inhibit gene expression at post-transcriptional level (Guo et al., 2010). MiRNAs regulate important biological processes such as cellular differentiation, apoptosis and proliferation (Bartel, 2009). Mi-RNA expression is altered in chronic diseases including cancer (Carthew & Sontheimer, 2009). They have been implicated in cancer initiation and progression and their expression is often down-regulated during carcinogenesis. Several studies have shown different miRNA expression profiles between normal and tumor tissues (He & Hannon, 2004).

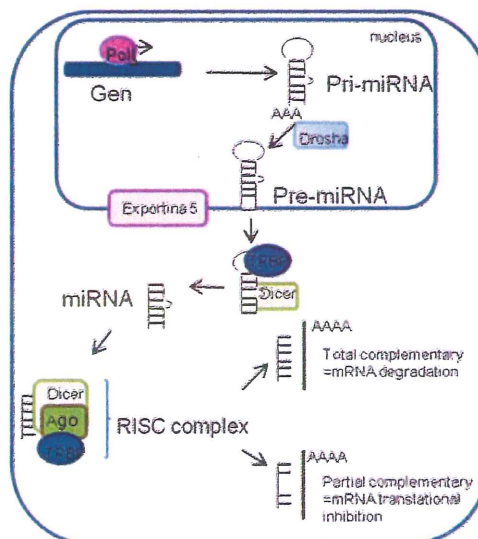


Figure 3. Molecular mechanism of mi-RNA synthesis.



MiRNAs are generated by the RNA polymerase II or by the RNA polymerase III as primary miRNAs (pri-miRNA) which acquire a stem-loop structure that it is processed by the ribonuclease Drosha creating the miRNA precursors (pre-miRNA) which are exported from the nucleus to the cytoplasm by the Exportin-5 protein. In the cytoplasm pre-miRNAs are further processed by Dicer, generating a duplex miRNA/miRNA. One strand of this hybrid is degraded and the free one becomes a mature miRNA which targets the 3'-untranslated region of specific mRNAs. When both mRNA and miRNA are fully complementary the mRNA is cleaved, but if complementation is imperfect, miRNAs can induce translational repression (Bartel, 2009; Shukla et al., 2011). Each miRNA is expected to control a wide spectrum of genes (Figure 3).

## miRNAs and HCC

As well as in other cancer, aberrant miRNA expression has been related to liver cancer development and progression (Calin & Croce, 2006; Gramantieri et al., 2008; Mott, 2009). Numerous studies have documented aberrant expression, both up-regulation and down-regulation, of miRNA in HCC. Up-regulation of miR-21, miR-17, miR-155, miR-191 and miR-221/222 or down-regulation of miR-122, 101, 195 and 339 has been associated to tumor progression (Elyakim et al., 2010; Meng et al., 2007; Pineau et al., 2010). MiR-21, miR-9 and miR-151 up-regulation and down-regulation of miR-200 and miR-23b is related to invasion and metastasis (Meng et al., 2007; Luedde, 2010; Wong et al., 2010). MiR-122 is the most abundant miRNA expressed in the liver and it is frequently down-regulated in HCC. Mice lacking the gene that encodes miR-122a are viable but develop temporally controlled steatohepatitis, fibrosis and HCC. The re-expression of miR-122a reduced disease manifestation and tumor incidence (Tsai et al., 2012). The down-regulation of miR-122 has also been associated with suppression of hepatic phenotype and gain of metastatic properties.

## miRNAs and HCV

A systematic RNA interference (RNAi) screening assay was carried out in the hepatoma Huh 7.5 cells (Randall et al., 2007). In this work they designed

siRNAs that target 62 host genes encoding proteins that physically interacts with HCV RNA or proteins or belong to cellular pathways though to modulate HCV infection. They demonstrated that 26 genes are targeted by siRNAs and reduced viral production by at least 3 fold. Some of these siRNAs targeted Dicer or other components of the RNAi silencing pathway, therefore confirming the role of 26 host genes that modulate HCV infection.

Significantly, miR-122 and miR-196 regulate HCV expression (Henke et al., 2008; Li et al., 2014). MiR-122 binds to HCV RNA forming a complex with Ago, this interaction stabilize HCV protecting the viral genome from 5'-exonuclease activity of the host degradation machinery (Shimakami et al., 2012). Conversely, miR-196 together with miR-199a, let-7b, and miR-448 represses HCV expression by directly interact with the HCV RNA in human hepatoma cells expressing HCV viral protein (Hou et al., 2010). MiRNAs miR-196, miR-296, miR-351, miR-431 and miR-448 induced by interferon Beta are also an antiviral defense mechanism against the HCV infection (Pedersen et al., 2007) in human hepatoma-derived Huh7 cells.

In the last decade, several studies have identified numerous cellular genes that are important for HCV infection. There is now a major push to adapt RNAi technology to the clinic (Berger & Randall, 2010).

## **HCC New Therapies Based in Chromatin-Modifier Drugs**

Epigenetic changes can be reversed by the action of several chemicals. DNA methylation and histone covalent modification events may induce inactivation of tumor suppressor genes and play critical roles in the initiation and progression of human cancer tumor. In order to reactivate these pathways, chromatin modifying drugs such as DNA methylation and histone deacetylase (HDAC) inhibitors have been development and seem to be promising agents for cancer therapy.

Sodium butyrate, trichostatin (TSA) and suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) are the main tested HDAC inhibitors (Reeves & Cserjesi, 1979). SAHA is a clinical promise for treatment of cancer including hepatocellular carcinoma (HCC). Interestingly SAHA inhibits HCV replication indicating that epigenetic treatment with this HDAC inhibitor may be a novel therapeutic approach for diseases associated with HCV infection such chronic hepatitis, liver cirrhosis and HCC (Sato et al., 2013).

In hepatocarcinogenesis, aberrant methylation of tumor related genes occurs not only in advanced tumor stages, it's a frequent and early event. DNA methylation inhibitors like 5-aza-2'-deoxycytidine (5-Aza-CdR) have been proposed to reactivate gene transcription of tumor affected genes. Knockdown of DNMT1 and reactivation of SFRP1 inhibits *in vivo* tumor growth and aggressiveness through the inhibition of  $\beta$ -catenin signaling activity in HCC cells (Quan et al., 2014).

Additional HDAC and DNMT inhibitors such Belinostat and Zebularine have been tested in clinical trial (Ma et al., 2014) but further investigations are necessary to understand the response to these epigenetic drugs.

## miRNA and Epigenetic Drugs

Chromatin remodeling by epigenetic treatment can directly activate miRNA expression and that activation of silenced tumor suppressor miRNA could be a novel therapeutic approach for human cancer. HCC patients with loss of miR-26 expression had shorter survival but a better response to interferon therapy than those patients whose tumors had high miR-26 expression of this miRNAs (Ji et al., 2009).

MiRNA expression can be regulated by HDAC and DNA methylation inhibitors. Panobiotat (LBH589) that inhibits histone deacetylation led to the highly aberrant modulation of several miRNAs in hepatocellular carcinoma (HCC) cell lines. This treatment exerts its anti-cancer effect by suppressing hsa-miRNA-19a, has-miRNA-19b1 and restores the expression of their corresponding tumor suppressor targets (Henrici et al., 2013).

Alternatively, some miRNA including miR-1, miR-124 and miR-203 are tumor-suppressor miRNA that inhibits the expression of genes implicated in hepatocellular carcinoma development. The expression of these miRNAs is epigenetically silenced so reactivation of these miRNAs by chromatin modifying drugs may be a new strategy in HCC treatment (Furuta et al., 2010). The miR-1 expression is markedly reduced by aberrant CpG island methylation in HCC compared with non-tumor liver tissues. DNA methylation inhibitor 5-azacytidine reactivates miR-1 and down-regulates FOXP1, MET and HDAC4 which are implicated in proliferation of HCC cells (Datta et al., 2008).

- Hamamoto R, Furukawa Y, Morita M, Iimura Y, Silva FP, Li M, Yagyu R, Nakamura Y (2004) SMYD3 encodes a histone methyltransferase involved in the proliferation of cancer cells. *Nature cell biology* 6: 731-740.
- He C, Xu J, Zhang J, Xie D, Ye H, Xiao Z, Cai M, Xu K, Zeng Y, Li H, Wang J (2012) High expression of trimethylated histone H3 lysine 4 is associated with poor prognosis in hepatocellular carcinoma. *Human pathology* 43: 1425-1435.
- He L, Hannon GJ (2004) MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nature reviews Genetics* 5: 522-531.
- Henke JI, Goergen D, Zheng J, Song Y, Schuttler CG, Fehr C, Junemann C, Niepmann M (2008) microRNA-122 stimulates translation of hepatitis C virus RNA. *The EMBO journal* 27: 3300-3310.
- Henrici A, Montalbano R, Neureiter D, Krause M, Stiewe T, Slater EP, Quint K, Ocker M, Di Fazio P (2013) The pan-deacetylase inhibitor panobinostat suppresses the expression of oncogenic miRNAs in hepatocellular carcinoma cell lines. *Molecular carcinogenesis*.
- Herceg Z, Paliwal A (2011) Epigenetic mechanisms in hepatocellular carcinoma: how environmental factors influence the epigenome. *Mutation research* 727: 55-61.
- Hernandez-Vargas H, Lambert MP, Le Calvez-Kelm F, Gouysse G, McKay-Chopin S, Tavtigian SV, Scoazec JY, Herceg Z (2010) Hepatocellular carcinoma displays distinct DNA methylation signatures with potential as clinical predictors. *PloS one* 5: e9749.
- Higgs MR, Lerat H, Pawlowsky JM (2010) Downregulation of Gadd45beta expression by hepatitis C virus leads to defective cell cycle arrest. *Cancer research* 70: 4901-4911.
- Hodawadekar SC, Marmorstein R (2007) Chemistry of acetyl transfer by histone modifying enzymes: structure, mechanism and implications for effector design. *Oncogene* 26: 5528-5540.
- Hou W, Tian Q, Zheng J, Bonkovsky HL (2010) MicroRNA-196 represses Bach1 protein and hepatitis C virus gene expression in human hepatoma cells expressing hepatitis C viral proteins. *Hepatology* 51: 1494-1504.
- Hung SY, Lin HH, Yeh KT, Chang JG (2014) Histone-modifying genes as biomarkers in hepatocellular carcinoma. *International journal of clinical and experimental pathology* 7: 2496-2507.
- Jenuwein T, Allis CD (2001) Translating the histone code. *Science* 293: 1074-1080.

- Ji J, Shi J, Budhu A, Yu Z, Forgues M, Roessler S, Ambs S, Chen Y, Meltzer PS, Croce CM, Qin LX, Man K, Lo CM, Lee J, Ng IO, Fan J, Tang ZY, Sun HC, Wang XW (2009) MicroRNA expression, survival, and response to interferon in liver cancer. *The New England journal of medicine* 361: 1437-1447.
- Jones PA, Baylin SB (2007) The epigenomics of cancer. *Cell* 128: 683-692.
- Kim MJ, White-Cross JA, Shen L, Issa JP, Rashid A (2009) Hypomethylation of long interspersed nuclear element-1 in hepatocellular carcinomas. *Modern pathology: an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 22: 442-449.
- Kondo Y, Shen L, Suzuki S, Kurokawa T, Masuko K, Tanaka Y, Kato H, Mizuno Y, Yokoe M, Sugauchi F, Hirashima N, Orito E, Osada H, Ueda R, Guo Y, Chen X, Issa JP, Sekido Y (2007) Alterations of DNA methylation and histone modifications contribute to gene silencing in hepatocellular carcinomas. *Hepatology research: the official journal of the Japan Society of Hepatology* 37: 974-983.
- Kurdistani SK (2011) Histone modifications in cancer biology and prognosis. *Progress in drug research Fortschritte der Arzneimittelforschung Progres des recherches pharmaceutiques* 67: 91-106.
- Lambert MP, Paliwal A, Vaissiere T, Chemin I, Zoulim F, Tommasino M, Hainaut P, Sylla B, Scoazec JY, Tost J, Herczeg Z (2011) Aberrant DNA methylation distinguishes hepatocellular carcinoma associated with HBV and HCV infection and alcohol intake. *Journal of hepatology* 54: 705-715.
- Lan F, Shi Y (2009) Epigenetic regulation: methylation of histone and non-histone proteins. *Science in China Series C, Life sciences / Chinese Academy of Sciences* 52: 311-322.
- Li HP, Leu YW, Chang YS (2005) Epigenetic changes in virus-associated human cancers. *Cell research* 15: 262-271.
- Li X, Yang W, Ye W, Jin L, He J, Lou L (2014) microRNAs: Novel players in hepatitis C virus infection. *Clinics and research in hepatology and gastroenterology*.
- Lin CH, Hsieh SY, Sheen IS, Lee WC, Chen TC, Shyu WC, Liaw YF (2001) Genome-wide hypomethylation in hepatocellular carcinogenesis. *Cancer research* 61: 4238-4243.
- Luedde T (2010) MicroRNA-151 and its hosting gene FAK (focal adhesion kinase) regulate tumor cell migration and spreading of hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 52: 1164-1166.

- Ma L, Chua MS, Andrisani O, So S (2014) Epigenetics in hepatocellular carcinoma: an update and future therapy perspectives. *World journal of gastroenterology: WJG* 20: 333-345.
- Magerl C, Ellinger J, Braunschweig T, Kremmer E, Koch LK, Holler T, Buttner R, Luscher B, Gutgemann I (2010) H3K4 dimethylation in hepatocellular carcinoma is rare compared with other hepatobiliary and gastrointestinal carcinomas and correlates with expression of the methylase Ash2 and the demethylase LSD1. *Human pathology* 41: 181-189.
- Meng F, Henson R, Wehbe-Janek H, Ghoshal K, Jacob ST, Patel T (2007) MicroRNA-21 regulates expression of the PTEN tumor suppressor gene in human hepatocellular cancer. *Gastroenterology* 133: 647-658.
- Morishita M, di Luccio E (2011) Cancers and the NSD family of histone lysine methyltransferases. *Biochimica et biophysica acta* 1816: 158-163.
- Mott JL (2009) MicroRNAs involved in tumor suppressor and oncogene pathways: implications for hepatobiliary neoplasia. *Hepatology* 50: 630-637.
- Ng SS, Yue WW, Oppermann U, Klose RJ (2009) Dynamic protein methylation in chromatin biology. *Cellular and molecular life sciences: CMLS* 66: 407-422.
- Nishida N, Goel A (2011) Genetic and epigenetic signatures in human hepatocellular carcinoma: a systematic review. *Current genomics* 12: 130-137.
- Nishida N, Kudo M, Nagasaka T, Ikai I, Goel A (2012) Characteristic patterns of altered DNA methylation predict emergence of human hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 56: 994-1003.
- Nishida N, Kudo M, Nishimura T, Arizumi T, Takita M, Kitai S, Yada N, Hagiwara S, Inoue T, Minami Y, Ueshima K, Sakurai T, Yokomichi N, Nagasaka T, Goel A (2013) Unique association between global DNA hypomethylation and chromosomal alterations in human hepatocellular carcinoma. *PloS one* 8: e72312.
- Nishida N, Nagasaka T, Nishimura T, Ikai I, Boland CR, Goel A (2008) Aberrant methylation of multiple tumor suppressor genes in aging liver, chronic hepatitis, and hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 47: 908-918.
- Okano M, Xie S, Li E (1998) Cloning and characterization of a family of novel mammalian DNA (cytosine-5) methyltransferases. *Nat Genet* 19: 219-220.

- Park HJ, Yu E, Shim YH (2006) DNA methyltransferase expression and DNA hypermethylation in human hepatocellular carcinoma. *Cancer letters* 233: 271-278.
- Pedersen IM, Cheng G, Wieland S, Volinia S, Croce CM, Chisari FV, David M (2007) Interferon modulation of cellular microRNAs as an antiviral mechanism. *Nature* 449: 919-922.
- Pineau P, Volinia S, McJunkin K, Marchio A, Battiston C, Terris B, Mazzaferro V, Lowe SW, Croce CM, Dejean A (2010) miR-221 overexpression contributes to liver tumorigenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107: 264-269.
- Pogribny IP, Rusyn I (2014) Role of epigenetic aberrations in the development and progression of human hepatocellular carcinoma. *Cancer letters* 342: 223-230.
- Quan H, Zhou F, Nie D, Chen Q, Cai X, Shan X, Zhou Z, Chen K, Huang A, Li S, Tang N (2014) Hepatitis C virus core protein epigenetically silences SFRP1 and enhances HCC aggressiveness by inducing epithelial-mesenchymal transition. *Oncogene* 33: 2826-2835.
- Randall G, Panis M, Cooper JD, Tellinghuisen TL, Sukhodolets KE, Pfeffer S, Landthaler M, Landgraf P, Kan S, Lindenbach BD, Chien M, Weir DB, Russo JJ, Ju J, Brownstein MJ, Sheridan R, Sander C, Zavolan M, Tuschl T, Rice CM (2007) Cellular cofactors affecting hepatitis C virus infection and replication. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104: 12884-12889.
- Reeves R, Cserjesi P (1979) Sodium butyrate induces new gene expression in Friend erythroleukemic cells. *The Journal of biological chemistry* 254: 4283-4290.
- Saito Y, Kanai Y, Nakagawa T, Sakamoto M, Saito H, Ishii H, Hirohashi S (2003) Increased protein expression of DNA methyltransferase (DNMT) 1 is significantly correlated with the malignant potential and poor prognosis of human hepatocellular carcinomas. *International journal of cancer Journal international du cancer* 105: 527-532.
- Saito Y, Kanai Y, Sakamoto M, Saito H, Ishii H, Hirohashi S (2002) Overexpression of a splice variant of DNA methyltransferase 3b, DNMT3b4, associated with DNA hypomethylation on pericentromeric satellite regions during human hepatocarcinogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99: 10060-10065.

- Sandoval J, Esteller M (2012) Cancer epigenomics: beyond genomics. *Current opinion in genetics & development* 22: 50-55.
- Sato A, Saito Y, Sugiyama K, Sakasegawa N, Muramatsu T, Fukuda S, Yoneya M, Kimura M, Ebinuma H, Hibi T, Ikeda M, Kato N, Saito H (2013) Suppressive effect of the histone deacetylase inhibitor suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) on hepatitis C virus replication. *Journal of cellular biochemistry* 114: 1987-1996.
- Shen J, Wang S, Zhang YJ, Kappil M, Wu HC, Kibriya MG, Wang Q, Jasmine F, Ahsan H, Lee PH, Yu MW, Chen CJ, Santella RM (2012) Genome-wide DNA methylation profiles in hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 55: 1799-1808.
- Shen J, Wang S, Zhang YJ, Wu HC, Kibriya MG, Jasmine F, Ahsan H, Wu DP, Siegel AB, Remotti H, Santella RM (2013) Exploring genome-wide DNA methylation profiles altered in hepatocellular carcinoma using Infinium HumanMethylation 450 BeadChips. *Epigenetics: official journal of the DNA Methylation Society* 8: 34-43.
- Shimakami T, Yamane D, Jangra RK, Kempf BJ, Spaniel C, Barton DJ, Lemon SM (2012) Stabilization of hepatitis C virus RNA by an Ago2-miR-122 complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109: 941-946
- Shukla GC, Singh J, Barik S (2011) MicroRNAs: Processing, Maturation, Target Recognition and Regulatory Functions. *Molecular and cellular pharmacology* 3: 83-92.
- Sistayanarain A, Tsuneyama K, Zheng H, Takahashi H, Nomoto K, Cheng C, Murai Y, Tanaka A, Takano Y (2006) Expression of Aurora-B kinase and phosphorylated histone H3 in hepatocellular carcinoma. *Anticancer research* 26: 3585-3593.
- Song MA, Tiirikainen M, Kwee S, Okimoto G, Yu H, Wong LL (2013) Elucidating the landscape of aberrant DNA methylation in hepatocellular carcinoma. *PloS one* 8: e55761.
- Sudo T, Utsunomiya T, Mimori K, Nagahara H, Ogawa K, Inoue H, Wakiyama S, Fujita H, Shirouzu K, Mori M (2005) Clinicopathological significance of EZH2 mRNA expression in patients with hepatocellular carcinoma. *British journal of cancer* 92: 1754-1758.
- Takai D, Yagi Y, Habib N, Sugimura T, Ushijima T (2000) Hypomethylation of LINE1 retrotransposon in human hepatocellular carcinomas, but not in surrounding liver cirrhosis. *Japanese journal of clinical oncology* 30: 306-309.



- Tangkijvanich P, Hourpai N, Rattanatanyong P, Wisedopas N, Mahachai V, Mutirangura A (2007) Serum LINE-1 hypomethylation as a potential prognostic marker for hepatocellular carcinoma. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* 379: 127-133.
- Tischoff I, Tannapfe A (2008) DNA methylation in hepatocellular carcinoma. *World journal of gastroenterology: WJG* 14: 1741-1748.
- Tsai WC, Hsu SD, Hsu CS, Lai TC, Chen SJ, Shen R, Huang Y, Chen HC, Lee CH, Tsai TF, Hsu MT, Wu JC, Huang HD, Shiao MS, Hsiao M, Tsou AP (2012) MicroRNA-122 plays a critical role in liver homeostasis and hepatocarcinogenesis. *The Journal of clinical investigation* 122: 2884-2897.
- Um TH, Kim H, Oh BK, Kim MS, Kim KS, Jung G, Park YN (2011) Aberrant CpG island hypermethylation in dysplastic nodules and early HCC of hepatitis B virus-related human multistep hepatocarcinogenesis. *Journal of hepatology* 54: 939-947.
- Wild L, Flanagan JM (2010) Genome-wide hypomethylation in cancer may be a passive consequence of transformation. *Biochimica et biophysica acta* 1806: 50-57.
- Wolf SS (2009) The protein arginine methyltransferase family: an update about function, new perspectives and the physiological role in humans. *Cellular and molecular life sciences: CMLS* 66: 2109-2121.
- Wong QW, Ching AK, Chan AW, Choy KW, To KF, Lai PB, Wong N (2010) MiR-222 overexpression confers cell migratory advantages in hepatocellular carcinoma through enhancing AKT signaling. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research* 16: 867-875.
- Wu LM, Yang Z, Zhou L, Zhang F, Xie HY, Feng XW, Wu J, Zheng SS (2010) Identification of histone deacetylase 3 as a biomarker for tumor recurrence following liver transplantation in HBV-associated hepatocellular carcinoma. *PloS one* 5: e14460.
- Yang XJ, Seto E (2007) HATs and HDACs: from structure, function and regulation to novel strategies for therapy and prevention. *Oncogene* 26: 5310-5318.
- Yao JY, Zhang L, Zhang X, He ZY, Ma Y, Hui LJ, Wang X, Hu YP (2010) H3K27 trimethylation is an early epigenetic event of p16INK4a silencing for regaining tumorigenesis in fusion reprogrammed hepatoma cells. *The Journal of biological chemistry* 285: 18828-18837.

## CAPÍTULO 7

# NUTRIGENÓMICA APLICADA AL CÁNCER

*Aurora Sánchez-Pacheco\*, Irene Francisco Recuero\*\* e Irene Barguilla\**

### Resumen

La genómica nutricional estudia tanto el efecto que ejercen los nutrientes sobre la expresión de nuestros genes (Nutrigenómica) y como las características del genoma individual determinan la respuesta a los nutrientes (Nutrigenética). Las características fenotípicas de un individuo vienen determinadas principalmente por sus características genéticas. En el año 2003 se consiguió secuenciar por completo el genoma humano identificándose alrededor de 25.000 genes, lo que supuso un importante avance en la investigación no solo en Medicina, sino en muchas otras disciplinas, entre ellas la Nutrición. El estudio del genoma humano y su regulación ha permitido un nuevo enfoque sobre como la genética puede ser un determinante esencial en la respuesta a los alimentos y como esta respuesta influye en importantes procesos como el crecimiento, el desarrollo y el riesgo de sufrir enfermedades como el cáncer (figura 1).

**Palabras Clave:** Cáncer, epigenética, regulación de la expresión génica, nutraceuticos, nutrieipigeneticos.

### 1. INTRODUCCIÓN

En el cáncer, la expresión de numerosos genes se ve alterada y de esta forma las células proliferan de forma descontrolada y pierden su capacidad de diferen-

---

\* Departamento Bioquímica-Facultad Medicina. Universidad Autónoma de Madrid.

\*\* Instituto de Investigación Sanitaria «La Paz» (IdiPAZ). Madrid.

ciación. Solo una parte de los cánceres son hereditarios es decir, causados por alteraciones o mutaciones en las células germinales, el resto (alrededor del 90 %) se sabe que son producidos por mutaciones en las células somáticas o por factores ambientales, entre los que se encuentran la alimentación, estilo de vida, exposición a agentes químicos, infecciones virales, radiaciones como la luz ultravioleta etc. Se cree que el 35 % de los cánceres podría estar relacionado con la alimentación <sup>[1][2]</sup>.

Durante el proceso de carcinogénesis se produce la desregulación de las principales funciones celulares incluyendo el metabolismo, el ciclo celular, la reparación del ADN, los mecanismos de apoptosis, respuesta inflamatoria, señalización celular, crecimiento y diferenciación celular. Diversos estudios indican que la alteración de estas funciones está relacionada con alteraciones a nivel genético y epigenético que alteran la expresión de genes supresores de tumores, reguladores del ciclo celular, genes relacionados con inducción de apoptosis y reparación del DNA, y genes que codifican por receptores nucleares y proteínas implicadas en rutas de señalización celular.

Existen alrededor de 25000 compuestos bioactivos diferentes que se encuentran en los alimentos y alrededor de 500 de estos compuestos han sido relacionados positiva o negativamente con la prevención y desarrollo de cáncer. Muchos de estos compuestos son capaces de producir estos efectos ya que son capaces de estimular o reprimir la expresión de genes relacionados con la aparición del cáncer. A lo largo de este capítulo trataremos de explicar los mecanismos por los cuales se regula la expresión de los genes haciendo referencia a algunos nutrientes que son capaces de alterar estos mecanismos <sup>[1][3]-[5]</sup>.

## 2. REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA

Los genes se transcriben dando un RNA mensajero el cual codifica por proteínas específicas que son las efectoras de la información guardada en los genes (figura 1b). El que un gen se exprese o no depende de complejos mecanismos de regulación génica entre los que podemos destacar la unión de factores de transcripción a las regiones reguladoras de un gen. Muchas vitaminas son capaces de regular la expresión de determinados genes mediante la unión a factores de transcripción. Como ejemplo, la vitamina D se une a factores de transcripción que se encuentran en el núcleo de las células denominados receptores nucleares, los cuales reconocen secuencias de ADN específicas en las regiones reguladoras

(promotores) de un gen y activan o inhiben la expresión de los genes que portan estas secuencias de reconocimiento (figura 2a). Otra forma de regulación de la expresión de los genes es la activación de factores que desencadenan la inducción de señales en cascada constituyendo lo que se denominan rutas de señalización (figura 2b). Muchos oncogenes y supresores de tumores como por ejemplo p53 o el factor AP1, actúan como factores de transcripción que regulan la expresión de genes y regulan numerosas rutas de señalización importantes en el desarrollo del cáncer. La desregulación de la actividad de estos factores de transcripción conduce a la desregulación de estos genes y rutas de señalización conduciendo al desarrollo de carcinogénesis <sup>[5][6]</sup>.

La expresión de un gen puede también verse modificada por alteraciones en el genoma que cambian su estructura o su secuencia. Este tipo de alteraciones se denominan mutaciones y pueden ser de muchos tipos. Los denominados polimorfismos son cambios de un nucleótido por otro (Single Nucleotide Polymorphism o SNPs) que se producen en más del 1 % de la población. Estos cambios pueden afectar a la expresión de una proteína o incluso a su función. De esta forma, las características genotípicas propias de cada individuo pueden condicionar la respuesta a un determinado nutriente. El ser portador de un SNP o combinación de SNPs relacionados con una determinada patología no determina necesariamente desarrollar esa enfermedad, pero si condiciones ambientales tales como la alimentación o el estilo de vida (por ejemplo fumador o no fumador) no son las apropiadas, el individuo portador de este determinado SNP puede tener mayor tendencia a desarrollar esa enfermedad que un individuo no portador de esa mutación, pero con los mismos hábitos de vida. Por este motivo el estudio de las características genéticas o lo que se denomina perfil genético de un individuo así como el ambiente que lo rodea (alimentación, estilo de vida, etc.) es un factor importante que la genómica nutricional debe tener en cuenta a la hora de analizar las propiedades y efectos biológicos de los nutrientes. Estos aspectos son estudiados en lo que se denomina Nutrigenética (figura 1a).

Hay otro tipo de alteraciones que no afectan a la secuencia del ADN, pero que si son capaces de regular la expresión de los genes, a este tipo de cambios se les denomina cambios epigenéticos. Las alteraciones epigenéticas comprenden procesos tales como la metilación del DNA, las modificaciones postraduccionales de las histonas y la regulación por micro-RNAs. Se cree que las mutaciones están relacionadas con cambios a largo plazo, mientras que los cambios epigenéticos se producen rápidamente como consecuencia de estímulos más recientes

como pueden ser un cambio de dieta. Otra diferencia entre cambios genéticos y epigenéticos es que muchas de las alteraciones epigenéticas son reversibles. Desde este punto de vista, las alteraciones epigenéticas son prometedoras dianas terapéuticas para la prevención del cáncer, ya que se ha observado que ocurren durante los primeros estadios de la carcinogénesis y pueden estar relacionados con la progresión de esta patología.

## **2.1. Regulación génica y nutrientes. Mecanismos relacionados con activación y progresión de cáncer.**

### **2.1.1. Inflamación**

La inflamación es la respuesta fisiológica a la invasión de microorganismos, traumas, irritación química y agentes extraños. La inflamación es usualmente una estrategia terapéutica, si esta inflamación persiste puede generar un estado de transformación del tejido inflamado. Existen múltiples mecanismos que unen la respuesta inflamatoria y el cáncer. En las primeras etapas de la inflamación y como respuesta ante un agente extraño, se generan una serie de citoquinas tales como (TNF- $\alpha$ ), interleuquina 1 (IL1), 6 (IL6), 12 (IL12) e interferón gamma (IFN $\gamma$ ). Este proceso va seguido de la secreción de citoquinas proinflamatorias (IL4, IL10 y TGF $\beta$ ) que se unen a sus receptores disparando diversas cascadas de señalización tales como las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK) que activan a factores de transcripción como NF- $\kappa$ B y c-jun dentro del complejo (AP1). Estos factores de transcripción activan la expresión de diversos genes como la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) y la ciclooxigenasa 2 (COX-2). Estos enzimas influyen en los niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS) y afectan a funciones celulares esenciales de manera que la ausencia de mecanismos de detoxificación para eliminar estos radicales libres puede aumentar el riesgo de cáncer. Por otro lado ROS, también activa señales en cascada que contribuyen al desarrollo de tumores y metástasis por regulación de la proliferación, muerte y motilidad células. La inflamación crónica resulta por lo tanto en un aumento en el daño al DNA, en la proliferación celular y en la alteración de mecanismos de reparación de DNA, inhibición de apoptosis y estimulación de angiogénesis e invasión que contribuyen a la progresión de cáncer (figura 2b).

Se ha descrito más de 700 compuestos capaces de inhibir la ruta de NF- $\kappa$ B y por tanto podrían ser agentes terapéuticos ideales como tratamientos anticancerígenos<sup>[3]</sup>. Curcumina y resveratrol han sido estudiados con más atención por sus propiedades antiinflamatorias y anticancerígenas mediadas por la inhibición de NF- $\kappa$ B. Otros compuestos como el ácido ursólico, la capsaicina presente en los pigmentos picantes, la sesamina del sésamo, la zerumbona del jengibre, la cafeína y el ácido betulínico (aislado de la capa externa del abedul) suprimen NF- $\kappa$ B induciendo apoptosis en numerosas líneas celulares de carcinoma<sup>[7]</sup>.

El factor AP-1 es un factor clave en tumorigénesis ya que participa en numerosos procesos celulares incluyendo la inflamación, la proliferación celular y la diferenciación celular. La expresión de AP1 está aumentada en numerosos cánceres y líneas celulares por lo que se cree que participa en la progresión tumoral siendo así una diana terapéutica para la prevención y el tratamiento del cáncer. Curcumina, resveratrol, genesteina, EGCG, el gingerol del jengibre, capsaicina, sulforafano, el ácido malsínico procedente de los derivados de las aceitunas, lycopeno, inhiben la activación de AP1 en diferentes modelos celulares procedentes de tumores y en modelos animales<sup>[7]</sup>.

El factor Nrf2 es un factor de transcripción que regula la transcripción de alrededor de 100 genes citoprotectores (figura 4b). Nrf2 está unido a Keap1 que lo mantiene en el citoplasma, una vez disociados Nrf2 se trasloca al núcleo, heterodimeriza con MAF y se une a elementos de respuesta de antioxidantes (ARE) que están en las regiones promotoras de ciertos genes como la glutathione S-transferasa (GSTP1) y hemooxigenasa 1 (HO-1) entre otros. Nrf2 media la respuesta ante estímulos que aumentan el estrés oxidativo de manera que aquellos compuestos que activan Nrf2 están siendo testados en ensayos clínicos con humanos como posibles agentes quimioprotectores contra el cáncer. Entre estos compuestos están el sulforafano, la curcumina y compuestos sintéticos como el oltipraz, las ditioltionas derivadas de las crucíferas como el brócoli o las coles de bruselas y los triterpenos<sup>[8]</sup>. La quercetina, la genesteina, los polifenoles del té verde como epigallocatequina (EGCG) y los polifenoles del té negro también regulan la cascada de señalización de Nrf2<sup>[9]</sup>. La curcumina abole el complejo Nrf2-Keap1 y conducen a la unión de Nrf2 a las secuencias ARE activando la expresión de la HO-1 que es el enzima limitante en la degradación del grupo hemo y contrarresta el estrés oxidativo e inflamatorio. Los índoles, los diterpenos del café, la parthenolide de la matricaria y el zerumbone son también nutra-

céticos con actividad quimiopreventiva actuando a diferentes niveles en la ruta de señalización de Nrf2.

### **2.1.2. Reparación del DNA**

El ADN puede ver alterada su secuencia por delecciones o mutaciones que se producen durante la replicación, o por la presencia de especies reactivas de oxígeno (ROS) como aniones superóxido, o radicales libres que se unen a las bases del ADN y a la desoxiribosa. Sin embargo, existen mecanismos de reparación del ADN que mantienen la estructura del ADN previniendo la alteración de genes esenciales en la prevención del cáncer, como por ejemplo los genes supresores de tumores<sup>[10]</sup>.

Se han realizado diversos estudios que muestran que la deficiencia en algunos nutrientes, como vitaminas (E y C), flavonoides e isotiocianatos, puede conducir a alteraciones en genes implicados en los sistemas de reparación del ADN. Estos compuestos parecen estimular la reparación del ADN en el caso de daños producidos por ROS. Ya que el daño al ADN puede modificar la progresión del ciclo celular haciendo que las células entren o no en apoptosis, estos compuestos son también capaces de modificar el ciclo celular y regular la apoptosis<sup>[11]</sup>.

### **2.1.3. Regulación del ciclo celular**

En los procesos cancerígenos se produce un crecimiento anómalo de las células que se debe a alteraciones en el crecimiento celular y en los sistemas de muerte celular. El ciclo celular transcurre a través de cuatro fases G1, S, G2, M2 cuya transición está controlada por quinasas (CDKs) e inhibidores de quinasas (CDIs) que detienen el ciclo celular en caso de que se necesite (figura 3). De esta forma la inducción de parada del ciclo celular y la inducción de apoptosis por algunos componentes de los nutrientes puede ser un mecanismo para inhibir el inicio y progresión tumoral. La alteración de los niveles de CDIs o CDKs por componentes de la dieta podría utilizarse parabloquear la proliferación descontrolada de las células cancerígenas. Dentro de los componentes identificados hasta el momento que son capaces de regular el ciclo celular está la isoflavona genisteína de la soja y el polifenol epigallocatequina 3-galato (EGCG) del té verde que inducen p21 y p27 que actúan como inhibidores de quinasas (CDIs). Y también inhiben CDK4, CDK2 y ciclina D1. p21 es inducida por isotiocianatos inhibiendo la proliferación celular en la fase G2-M<sup>[12]</sup>.

#### 2.1.4. *Apoptosis*

Uno de los mecanismos de defensa que utilizan nuestras células contra el cáncer es la apoptosis, proceso mediante el cual se eliminan las células que presentan alguna mutación o alteración (figura 4a). La apoptosis está regulada por el balance entre moléculas proapoptóticas como BAX y BAK<sup>[19]</sup> y moléculas antiapoptóticas como BCL-2 y BCL-X. El desbalance entre estas moléculas hace que el citocromo c se libere de la membrana mitocondrial y forme un complejo con caspasa 9 activándose a continuación las caspasas 3, 5 y 7<sup>[13]</sup> que hacen que las células sufran cambios morfológicos y entren en apoptosis. Algunos compuestos tienen la capacidad de disminuir la expresión de moléculas antiapoptóticas como BCL-2 y BCL-X y estimulan la expresión de moléculas proapoptóticas tales como BAX y BAK induciendo de esta manera la apoptosis. Entre este tipo de compuestos se encuentran el selenio presente en los frutos secos, la EGCG, el fenilisocianato de las crucíferas, el ácido retinoico un derivado de la vitamina A presente en lácteos y que puede ser obtenida a partir de carotenos de frutas y verduras, el sulforafano del brócoli, la curcumina, el resveratrol del vino o las uvas rojas, la apigenina del perejil, de la cebolla y del ajo, y la quercetina presente en la cebolla y en las manzanas<sup>[14]</sup>. Algunos nutrientes también activan quinasas proapoptóticas como la c-jun quinasa o inhiben el factor NF- $\kappa$ B con actividad antiapoptótica.

#### 2.1.5. *Angiogénesis.*

El desarrollo de nuevos vasos sanguíneos a partir de células endoteliales es un proceso crucial para el desarrollo y progresión del tumor. Durante la angiogénesis las células endoteliales son estimuladas por varios factores de crecimiento como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) produciéndose una migración celular hacia las regiones donde se necesita el aporte de sangre. La prevención de la expansión de nuevos vasos es otro de los mecanismos de inhibición del crecimiento tumoral. Los compuestos de la dieta que inhiben la angiogénesis son polifenoles como epigallocatequina-3-galato, resveratrol, curcumina, genesteína y ácidos grasos poliinsaturados. En particular, el ácido eicosapentanoico (EPA) y el docosahexanoico (DHA) se han asociado con la mejora en el pronóstico del cáncer de mama. Estos nutrientes, que se encuentran principalmente en el aceite de oliva, ejercen efectos antiangiogénicos inhibiendo la producción de diferentes mediadores an-



giogénicos y también reducen la inflamación a través de diversos mecanismos entre los que se encuentra la supresión de NF- $\kappa$ B. El aceite de colza se ha visto que es útil en la reducción del volumen de los tumores de mama en ratón y también se ha observado que su consumo, durante la época prenatal actúa como agente de prevención para reducir el cáncer de mama en humanos<sup>[15]</sup>.

## **2.2. Regulación epigenética y nutrientes. Mecanismos relacionados con activación y progresión de cáncer.**

El ADN en eucariotas está empaquetado en el interior del núcleo constituyendo lo que se denomina cromatina. La unidad fundamental de la cromatina es el nucleosoma formado por un fragmento de DNA de 146pb organizado alrededor de un octámero de histonas (H3, H4, H2A y H2B)<sup>[16]</sup>. La remodelación de la estructura de la cromatina es un paso fundamental en procesos tales como la regulación de la expresión génica, apoptosis, replicación, reparación del DNA y segregación y condensación cromosómica. Alteraciones en estos procesos pueden conducir a diversas enfermedades humanas como el cáncer<sup>[17, 18]</sup>. Para que un gen se transcriba y se traduzca es necesario que la cromatina sea accesible, por ejemplo, a factores de transcripción. Con este fin, la estructura de la cromatina es modulada a través de diversos procesos entre los que se encuentran la metilación del DNA, las modificaciones covalentes de las histonas y los micro-RNAs. Como ya hemos indicado anteriormente algunos de estos cambios epigenéticos no alteran la secuencia del DNA o del RNA, pero son capaces de modificar la expresión génica. Durante el proceso de división celular estos cambios epigenéticos son transmitidos a las células hijas manteniendo así la memoria celular. En los últimos años se ha puesto gran interés en el estudio de los cambios epigenéticos en el campo de la nutrición por dos razones fundamentalmente: agentes ambientales como nutrientes y agentes químicos inducen cambios epigenéticos a corto plazo y además algunos de estos cambios son reversibles por lo que ciertos nutrientes podrían utilizarse como agentes terapéuticos en diversas patologías. Numerosos nutrientes modifican el epigenoma y se les ha denominado nutriepigenéticos. Algunos de ellos son el folato, polifenoles del té verde, café, frutas tales como las manzanas y las frambruesas negras, la genesteína e isoflavonas de la soja, la curcumina, el resveratrol, la dihidroquercetina, el ácido nordihidroguaiaarético (NDGA), licopenos, garcinol, el indol-3-carbino (I3C), diindolilmetano (DIM) contenidos en crucíferas, sulforafano, etc.<sup>[19]</sup>.

### ***2.2.1. Metilación del DNA y su relación con cáncer. Nutrientes que regulan la metilación del DNA.***

La metilación del DNA consiste en la adición de un grupo metilo (CH<sub>3</sub>) procedente de la S-adenosyl-L metionina (SAM) a un nucleótido de citosina cuando se encuentra adyacente a un residuo de guanina generándose así 5'-methylcitosina. En mamíferos la metilación ocurre en regiones de más de 200pb ricas en el dinucleótido 5'-CPG-3' en las denominadas islas CpGs. La metilación del ADN es mediada por actividades enzimáticas que se denominan ADN methyltransferasas (DNMT1, DNMT3A y DNMT3B). DNMT1 actúa durante la replicación manteniendo la metilación del DNA parental, que se copia y se transmite a la hebra de ADN sintetizada. DNMT3a y DNMT3B son metilasas de «novo» es decir producen la metilación de regiones CpGs sin metilar.

La metilación del DNA en regiones promotoras que están normalmente sin metilar conduce a la inhibición de la transcripción de ese gen ya que bloquea el acceso a factores de transcripción que se unen a secuencias reguladoras y son responsables de la expresión de ese gen<sup>[20]</sup>. Este fenómeno se observa con frecuencia en genes supresores de tumores, aunque también se ha observado en genes importantes en los procesos de diferenciación o apoptosis (figura 5a). Existen otras regiones, aparte de las zonas promotoras, que pueden ser diana de metilación. Secuencias repetidas tales como repeticiones en el DNA ribosomal, DNA satélites o repeticiones centroméricas se encuentran altamente metiladas. Esta metilación limita la accesibilidad a factores de transcripción pero contribuye a la estabilidad cromosómica. Durante el envejecimiento, la carcinogénesis u otros daños crónicos, se produce la hipometilación de este DNA produciendo inestabilidad genómica y alteraciones cromosómicas.

GSTP1 es una isoenzima que conjuga agentes químicos y carcinógenos con el tripéptido glutatión y de esta forma aumenta su excreción y detoxificación. La inducción de GSTP1 es controlada como ya mencionamos anteriormente por la ruta de señalización de Nrf2 constituyendo una ruta fundamental de quimiopreención en cáncer. La pérdida de expresión de GSTP1 por hipermetilación es frecuentemente observada en cáncer de próstata. La re-expresión de GSTP1 después del tratamiento con selenito sódico, un suplemento en alimentación animal, se ha observado en células de cáncer de próstata. Dosis bajas de este compuesto disminuyen la expresión de DNMT1 reduciendo la metilación del DNA y reexpresándose GSTP1. Los polifenoles del té verde y la EGCG también redu-

cen la metilación del DNA en células de cáncer de próstata inhibiendo, no la expresión de DNMTs, sino su actividad enzimática.

En cáncer de mama también se ha observado que fitoestrógenos de la soja tales como genesteina y daidzeina y el licopeno derivado del tomate reducen la metilación de GSTP1 en células de cáncer de mama. La re-expresión del RNA mensajero de GSTP1 se observó tras el tratamiento de células MDA-MB-468 con licopeno a lo largo de una semana, sin embargo el efecto de la genesteina parece ser más lento.

La curcumina es otro nutriente ampliamente estudiado como agente quimiopreventivo. En este caso, se ha observado que el tratamiento de células de cáncer de próstata TRAMP C1 con curcuma reduce la metilación del promotor de Nrf2 re-expresándose Nrf2 y el gen de la NAD(P)H: quinona oxido reductasa (NQO1) también importante en el proceso de detoxificación celular.

La metilación del DNA es un proceso importante también en la regulación del ciclo celular. La expresión de p16<sup>INK4A</sup> inhibidor de CDK4 esta inactivada en el 50 % de los cánceres, por diversos mecanismos, entre los cuales se encuentra la metilación del DNA. EGCG disminuye la actividad y la expresión de las DNMT1, DNMT3A y DNMT3B, lo cual produce la sobreexpresión de p16 en células de cáncer de colon HCT116, de cáncer esófago KYSE510 y en células de cáncer epidermoide A431. La genesteina tiene un efecto similar en células de cáncer de esófago KYSE510.

El gen RASSF1A es un gen supresor de tumores cuya hipermetilación es frecuente en diferentes tipos de cáncer como el de pulmón, el de mama, páncreas, riñón, hígado, cérvix, nasofaríngeo, próstata y tiroides entre otros. El tratamiento con mahanina presente en algunos vegetales asiáticos consigue re-expresar RASSF1A en diferentes líneas de cáncer de próstata inhibiendo la proliferación celular. Un derivado de mahanina secuestra DNMT3B en el citoplasma y de hecho la depleción de DNMT3B produce la sobreexpresión de RASSF1A.

El gen supresor de tumores PTEN está hipermetilado en células de cáncer de mama MCF-7 y MDA-MB-231. El tratamiento con all-trans-retinoico, vitamina D3 y resveratrol de forma independiente o en combinación con análogos de nucleótidos como 5-aza-2'-dexycitosa produce la desmetilación y re-expresión de PTEN por inhibición de la expresión de la DNMT1 en células

MCF-7. Sin embargo, en la línea altamente metastásica MDA-MB-231 tan solo la vitamina D3 parece ser efectiva.

Como ya indicamos anteriormente, la reparación del DNA es un mecanismo esencial para mantener la estabilidad genómica. Este proceso está regulado por diferentes genes entre los que se encuentran hMLH1 y MGMT, los cuales están frecuentemente inactivados por hipermetilación en diversos cánceres entre ellos el cáncer de colon. La metilación del hMLH1 conduce a inestabilidad por microsátélites que se asocian con cáncer colorectal no poliposo hereditario, pero también es frecuente en tumores de endometrio y gástricos. EGCG y genesteína reducen la metilación de las regiones promotoras de MGMT y hMLH1 sobre-expresando estos genes en células humanas de carcinoma de esófago. Los polifenoles de la manzana también re-expresan hMLH1 en células de cáncer de colon mediante la inhibición en la expresión de DNMT1 y DNMT3b.

### ***2.2.2. Modificaciones covalentes de las histonas***

Las histonas son proteínas muy bien conservadas entre distintas especies, contienen un dominio globular y dos extremos protuberantes que se denominan colas de histonas en las regiones N-terminal y C-terminal. La región N-terminal contiene unos 20-30 aa mientras que la región C-terminal es más corta. Ambos extremos pueden ser modificados por acetilación, metilación, fosforilación, ADP-ribosilación, deaminación y ubiquitinación, reacciones catalizadas por diferentes familias de enzimas (figura 5b). Alteraciones en los niveles globales y distribución de histonas principalmente en las regiones promotoras de los genes son marcadores de cáncer. En general, células con niveles globales de histonas disminuidos es un mal pronóstico ya que incrementa el riesgo de recurrencia del tumor y disminuye la probabilidad de sobrevivencia.

Al igual que la metilación del DNA, algunas modificaciones de histonas son reversibles. La acetilación de histonas es llevada a cabo por acetiltransferasas de histonas (HATs) que añaden un grupo acetilo a un residuo de lisina. Este cambio puede ser eliminado por la acción de histonas desacetilasas (HDACs). Normalmente existe un equilibrio entre HATs y HDACs que mantiene los niveles adecuados de lisinas acetiladas de modo que la acetilación disminuye las interacciones entre el ADN y las histonas. Esto favorece la apertura de la estructura de la cromatina y favorece la interacción de factores de transcripción con el DNA, activándose la transcripción. Por lo tanto, la acetilación mediada por

HAT favorece la transcripción, mientras que la desacetilación mediada por HDACs reprime la transcripción. TAF 250, p300 y PCAF son algunas de las 25 HATs que se han identificado hasta el momento. Las HDACs son en total 18 proteínas agrupadas en familias: clase I, II, y IV que incluyen HDACs 1-11 cuya actividad depende de Zinc, mientras que las HDACs de clase IV que se denominan Sirtuinas (SIRTs) utilizan  $\text{NAD}^+$  como cofactor.

Otra modificación postraducciona de las histonas es la metilación de residuos de lisina y arginina. La metilación de lisinas y argininas ocurre principalmente en las histonas H3 y H4. La metilación en argininas es catalizada por la familia de la PRMTs mientras que la metilación de lisinas es catalizada por las metiltransferasas de histonas (HMTs) formadas por unos 50 miembros agrupados en seis familias. Algunas de las HMTs más estudiadas son la Suv39h, la G9a, la SET1, SET2 y SMYD. La metilación de lisinas puede activar o reprimir la transcripción, por ejemplo la metilación en H3K4, H3K36 y H3K79 se asocia con activación transcripcional, mientras que la metilación en H3K9, H3K27 y H4K20 se asocia frecuentemente con represión transcripcional. La metilación de histonas es también reversible y estas reacciones son catalizadas por las histonas desmetilasas (HDMs) como las desmetilasa LSD1 y Jumanji (Jmjs). Muchos nutrientes son capaces de alterar los niveles y/o la actividad de HDACs, HATs, HMTs y HDMs. A continuación daremos algunos ejemplos que afectan a procesos implicados en cáncer.

p21 es una CKI que inhibe la actividad de la CDK2/ciclina E que regula la progresión del ciclo celular en la fase S. La deficiencia de p21 conduce por tanto a la desregulación del ciclo celular, pero también a alteraciones en los procesos de diferenciación celular, apoptosis, reparación del DNA y transcripción génica. La expresión de p21 parece estar regulada a nivel transcripcional mediante la acetilación de histonas. La inhibición de HDACs con el consiguiente reclutamiento de otros factores de transcripción como p300 y PCAF con actividad acetiltransferasa (HAT) y otros factores como p53 y Sp1 facilitan la transcripción de p21.

En la prevención del cáncer de colon, el consumo de fibra es uno de los nutrientes recomendados, esto es debido a que la fibra escapa a la digestión en el estómago y en el intestino delgado, y fermenta en el colon produciendo ácido acético, ácido propiónico y ácido butírico. El ácido butírico es el principal componente protector de las dietas ricas en fibra. El efecto protector de la fibra parece estar relacionado con el hecho de que el ácido butírico media la inhibición de HDACs activando la transcripción de p21 e inhibiendo el crecimiento celular en células de cáncer de colon.

Derivados de selenio presentes en la dieta también inhiben la actividad de las HDACs y aumentan la acetilación global de la histona H3 y los niveles de expresión de p21, este efecto produce parada del ciclo celular e inducción de apoptosis. El sulforafano también ejercería efectos similares aumentando la expresión de p21 mediante la inhibición de la actividad de las HDACs. En distintos tipos de cánceres, incluyendo el cáncer de colon, próstata e íleon, el tratamiento con sulforafano durante 10 minutos consiguió reducir el tamaño del tumor en un modelo de ratón. En un estudio piloto en humanos realizado con tres voluntarios se observó, que la ingesta de 68 gramos de brócoli que contiene sulforafano, mostraban después de 3 y 6 horas desde la ingesta, la hiperacetilación de la histona H3 y H4 en células mononucleares de sangre periférica (PBMCs). La acetilación y los niveles de estas histonas retornaban a niveles normales después de 24 y 48 horas. Este efecto transitorio podría indicar la necesidad de ingerir estos alimentos con cierta frecuencia.

La actividad de las HDAC también resulta inhibida por compuestos órgano sulfurados como el dialildisulfido (DADS) que se encuentran en el ajo y otros bulbos como cebollas, puerros y cebolletas. Estos compuestos se metabolizan a alil mercaptano (AM) el cual inhibe las HDAC aumentando la acetilación de histonas en células de eritroleucemia, en hepatocitos y en colonocitos.

Algunos compuestos que modulan los niveles de acetilación de histonas mediante la inhibición de HDACs también son capaces de regular la actividad o expresión de HATs. Este es el caso de la genesteína que incrementa la síntesis de proteínas con actividad histona acetiltransferasa tales como p300, PCAF y HAT1 en líneas celulares de cáncer de próstata. De esta forma, incrementan los niveles de acetilación del residuo de lisina 4 en la histona H3 (H3K4) en la región del inicio de transcripción de p16 y p21 y aumentan la expresión de ambas CKIs.

La caetocina es un inhibidor de las metiltransferasas de histona Suv39h que cataliza la trimetilación del residuo de lisina 9 en la histona H3 (H3K9me3), marca epigenética asociada con represión de la expresión génica. El efecto de caetocina ha sido estudiado en células de microglía donde se observó que tras el tratamiento se produce una disminución de los niveles de H3K9me3 en el promotor de p21 estimulándose la expresión de p21.

En piel, el tratamiento de EGCG reduce los niveles de metilación del residuo de lisina 27 (H3K27me3) por inhibición de las histonas metiltransferasa que ca-

talizan este cambio epigenético (EZH2 y BM1-1) disminuyendo la supervivencia celular.

También la genesteína utilizada en células de cáncer de próstata fue capaz de re-expresar PTEN induciendo p53 e inhibiendo NF- $\kappa$ B. Este efecto es mediado por un aumento en la acetilación de p53 y pérdida de la metilación en H3K9 por inhibición de la expresión de SIRT1 inducida por genesteína.

Las histonas no son las únicas proteínas que pueden ser modificadas postraduccionalmente. EL factor NF- $\kappa$ B es también regulado por fosforilación, acetilación, metilación y ubiquitinación. La acetilación de la lisina 310 inducida por p300 es necesaria para que la actividad transactivadora de NF- $\kappa$ B y curiosamente el ácido anacárdico, compuesto de los anacardos, inhibe p300 bloqueando así la activación de NF- $\kappa$ B, por lo que ha sido sugerido que este compuesto podría resultar útil en la prevención del cáncer.

El garcinol es un inhibidor de PCAF y p300 por lo que también reduce la expresión de proteínas anti-apoptóticas diana de NF- $\kappa$ B como survivina, BCL2, XIAP and cFLIP. La curcumina tiene efectos similares sobre p300 mientras que PCAF, HDAC y HTM no se ven afectadas. p300 HAT también es inhibida por el ácido gálico.

### **3. TERAPIAS ANTICANCERÍGENAS BASADAS EN NUTRIENTES (NUTRACÉUTICOS)**

Algunos componentes de la dieta se han utilizado como tratamiento conjunto con algunos fármacos. Por ejemplo, dietas con altos niveles en aceite de oliva ejercen un efecto protector contra el cáncer de colon. Estos nutrientes se han utilizado conjuntamente con el fármaco sulindac, una droga no esteroidea con actividad anti-inflamatoria, que inhibe COX-2 e inducen apoptosis regulando la expresión de BCL-2 y caspasa 3.

La isoflavona de soja, daizain, aumenta la capacidad del tamoxifeno inhibiendo la incidencia y la multiplicidad del tumor en el cáncer de mama mediante protección contra el daño al DNA.

La genesteína, la curcumina, el resveratrol, la epigallocatequina, el índole-3-carbino, la proantocianidina y la vitamina D<sub>3</sub> aumentan la eficiencia de las drogas utilizadas en quimioterapia y radioterapia modificando la actividad de

las mismas y modificando la actividad de mecanismos de proliferación y supervivencia regulados por AKT, NF-KB y COX-2.

Hay otros compuestos que al utilizar la misma diana molecular, pueden disminuir la dosis de drogas utilizadas en el tratamiento del cáncer disminuyendo así los efectos secundarios de dichos medicamentos. Por ejemplo, una dieta rica en ácidos grasos omega-3 inhibe la actividad inflamatoria de COX-2 utilizándose con dosis bajas de celocoxib en la prevención del cáncer de colon. El índole-3-carbamido, presente en crucíferas, es un agente protector de hepatotoxicidad de la droga CT743 y trobectidina sin disminuir su eficiencia.

Algunos nutrientes en combinación ejercen efectos beneficiosos en la prevención del cáncer de mama, este es el caso de la vitamina D<sub>3</sub> y el 9-cis retinoico aunque si se utilizan por separado no tienen ningún efecto. Esto se debe a que ambos compuestos se unen a sus respectivos receptores (VDR y RXR respectivamente) y regula la transcripción de genes implicados en proliferación, diferenciación y apoptosis. Otro ejemplo es el tratamiento combinado de S-acilcisteína y licopeno capaz de suprimir el desarrollo de cáncer gástrico. La combinación de vitamina D<sub>3</sub> puede también combinarse con genesteína, este tratamiento conjunto produce la inhibición del crecimiento de células DU194 de cáncer de próstata a bajas concentraciones de ambos compuestos. La genesteína parece potenciar la acción de la vitamina D<sub>3</sub> por inhibición directa de la actividad CYP24 que incrementa la vida media de la vitamina D<sub>3</sub>, lo cual resulta en un incremento de los niveles de receptor de VDR. Este efecto dual de la genesteína conduce a un aumento en la respuesta de la vitamina D y de la activación de los genes diana, haciendo a las células más sensibles a la inhibición del crecimiento y a señales proapoptóticas de la vitamina D.

Así mismo, los nutrientes que alteran rutas diferentes pueden cooperar para inhibir el crecimiento tumoral. Este es el caso de la quercetina y la genesteína que inhiben la proliferación de células de carcinoma en el ovario modificando diferentes estadios del ciclo celular y diferentes rutas de traducción de señales. Quercetina produce la parada del ciclo celular en la fase G1 y S mientras que la genesteína bloquea G2 y M. La quercetina también interacciona sinérgicamente con resveratrol causando parada del ciclo celular en células de leucemia humana. EGCG y curcumina inhiben sinérgicamente el crecimiento de células de epitelio oral normales, premalignas y malignas. Mientras que EGCG bloquea las células en G1, curcumina bloquea las células en S/G2M.



El selenio y la vitamina E tienen un efecto sinérgico en la inducción de apoptosis. El selenio activa caspasa 1 y 12 mientras que la vitamina E activa la caspasa 9. Con respecto al cáncer de mama la suplementación de selenio es un micronutriente esencial con propiedades anticancerígenas en diferentes modelos animales. El selenio además parece reducir la metástasis de cáncer de mama en modelos animales.

Hasta el momento dietas ricas en grasa, consumo de fibra y vitaminas son los hábitos más estudiados por su asociación con cáncer junto con los suplementos probióticos.

## BIBLIOGRAFÍA

- [1] SUNG B, PRASAD S, YADAV VR, LAVASANIFAR A, AGGARWAL BB. Cancer and diet: How are they related? *Free radical research*. 2011 Aug;45(8):864-79. PubMed PMID: 21651450. Pubmed Central PMCID: 3564493.
- [2] MILNER JA. Nutrition and cancer: essential elements for a roadmap. *Cancer letters*. 2008 Oct 8;269(2):189-98. PubMed PMID: 18599198.
- [3] DAVIS CD. Nutritional interactions: credentialing of molecular targets for cancer prevention. *Experimental biology and medicine*. 2007 Feb;232(2):176-83. PubMed PMID: 17259324.
- [4] HARTMULLER VW, MILNER JA. Nutrition: what do cancer survivors need? *Nutrition and cancer*. 2012;64(1):1-3. PubMed PMID: 22172285.
- [5] BEN-NERIAH Y, KARIN M. Inflammation meets cancer, with NF-kappaB as the matchmaker. *Nature immunology*. 2011 Aug;12(8):715-23. PubMed PMID: 21772280.
- [6] GUPTA SC, KIM JH, KANNAPPAN R, REUTER S, DOUGHERTY PM, AGGARWAL BB. Role of nuclear factor kappaB-mediated inflammatory pathways in cancer-related symptoms and their regulation by nutritional agents. *Experimental biology and medicine*. 2011 Jun 1;236(6):658-71. PubMed PMID: 21565893. Pubmed Central PMCID: 3141285.
- [7] HAHM ER, PARK S, YANG CH. 7, 8-dihydroxyflavanone as an inhibitor for Jun-Fos-DNA complex formation and its cytotoxic effect on cultured human cancer cells. *Natural product research*. 2003 Dec;17(6):431-6. PubMed PMID: 14577694.
- [8] JEONG WS, JUN M, KONG AN. Nrf2: a potential molecular target for cancer chemoprevention by natural compounds. *Antioxidants & redox signaling*. 2006 Jan-Feb;8(1-2):99-106. PubMed PMID: 16487042.

- [9] ZHAO CR, GAO ZH, QU XJ. Nrf2-ARE signaling pathway and natural products for cancer chemoprevention. *Cancer epidemiology*. 2010 Oct;34(5):523-33. PubMed PMID: 20638930.
- [10] SANCAR A, LINDSEY-BOLTZ LA, UNSAL-KACMAZ K, LINN S. Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annual review of biochemistry*. 2004;73:39-85. PubMed PMID: 15189136.
- [11] MOLLER P, LOFT S. Interventions with antioxidants and nutrients in relation to oxidative DNA damage and repair. *Mutation research*. 2004 Jul 13;551(1-2):79-89. PubMed PMID: 15225583.
- [12] AGARWAL R. Cell signaling and regulators of cell cycle as molecular targets for prostate cancer prevention by dietary agents. *Biochemical pharmacology*. 2000 Oct 15;60(8):1051-9. PubMed PMID: 11007941.
- [13] THORNBERRY NA, LAZEBNIK Y. Caspases: enemies within. *Science*. 1998 Aug 28;281(5381):1312-6. PubMed PMID: 9721091.
- [14] HU R, KONG AN. Activation of MAP kinases, apoptosis and nutrigenomics of gene expression elicited by dietary cancer-prevention compounds. *Nutrition*. 2004 Jan;20(1):83-8. PubMed PMID: 14698020.
- [15] ARAGON F, PERDIGON G, DE MORENO DE LEBLANC A. Modification in the diet can induce beneficial effects against breast cancer. *World journal of clinical oncology*. 2014 Aug 10;5(3):455-64. PubMed PMID: 25114859. Pubmed Central PMCID: 4127615.
- [16] KORNBERG RD, LORCH Y. Twenty-five years of the nucleosome, fundamental particle of the eukaryote chromosome. *Cell*. 1999 Aug 6;98(3):285-94. PubMed PMID: 10458604. eng.
- [17] SANTOS-ROSA H, CALDAS C. Chromatin modifier enzymes, the histone code and cancer. *Eur J Cancer*. 2005 Nov;41(16):2381-402. PubMed PMID: 16226460. eng.
- [18] WANG GG, ALLIS CD, CHI P. Chromatin remodeling and cancer, Part II: ATP-dependent chromatin remodeling. *Trends in molecular medicine*. 2007 Sep;13(9):373-80. PubMed PMID: 17822959. eng.
- [19] GERHAUSER C. Cancer chemoprevention and nutriepigenetics: state of the art and future challenges. *Topics in current chemistry*. 2013;329:73-132. PubMed PMID: 22955508.
- [20] ESTELLER M. Epigenetic gene silencing in cancer: the DNA hypermethylome. *Human molecular genetics*. 2007 Apr 15;16 Spec No 1: R50-9. PubMed PMID: 17613547.